

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
Instituto de Ciência e Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Juliane Suzuki Amaral

**INFLUÊNCIA DO COACERVADO DE PROTEÍNAS DO SORO DO
LEITE E GALACTOOLIGOSSACARÍDEO NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA, PERFIL DOS FOSFOLIPÍDEOS E MICROBIOTA
INTESTINAL EM CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA
POR DIETA**

São José dos Campos – SP

2018



Juliane Suzuki Amaral

**INFLUÊNCIA DO COACERVADO DE PROTEÍNAS DO SORO DO
LEITE E GALACTOOLIGOSSACARÍDEO NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA, PERFIL DOS FOSFOLIPÍDEOS E MICROBIOTA
INTESTINAL EM CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA
POR DIETA**

São José dos Campos – SP

2018

Juliane Suzuki Amaral

**INFLUÊNCIA DO COACERVADO DE PROTEÍNAS DO SORO DO
LEITE E GALACTOOLIGOSSACARÍDEO NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA, PERFIL DOS FOSFOLIPÍDEOS E MICROBIOTA
INTESTINAL EM CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA
POR DIETA**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Instituto de Ciências e
Tecnologia, para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia

Orientadora:

Prof^a. Dra. Elisa Esposito

Coorientador:

Prof. Dr. Gabriel Inácio M. H. de Souza

São José dos Campos – SP

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Unifesp São José dos campos
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

AJ94i Amaral, Juliane Suzuki
INFLUÊNCIA DO COACERVADO DE PROTEÍNAS DO SORO DO
LEITE E GALACTOOLIGOSSACARÍDEO NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA, PERFIL DOS FOSFOLIPÍDEOS E
MICROBIOTA INTESTINAL EM CAMUNDONGOS COM
OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA / Juliane Suzuki
Amaral
Elisa Esposito. -- São José dos Campos, 2018.
109 p.
Coacervate whey protein and
galactooligosaccharide in the inflammatory
response, phospholipid profile and gut
microbiota in induced obesity mice

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Doutorado em Biotecnologia) -- Universidade
Federal de São Paulo - Instituto de Ciência e
Tecnologia, 2018.

1. Obesidade. 2. Prebióticos. 3. Microbiota
intestinal . I. Esposito, Elisa , orient. II.

INSTITUIÇÃO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

Campus São José dos Campos

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM
BIOTECNOLOGIA**

Este trabalho foi realizado no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – com o apoio financeiro da Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino superior (CAPES).

Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia:

Prof^a. Dra. Claudia Campos

TERMO DE AVALIAÇÃO

Juliane Suzuki Amaral

Influência do coacervado de proteínas do soro do leite e galactooligossacarídeo na resposta inflamatória, perfil dos fosfolípídeos e microbiota intestinal em camundongos com obesidade induzida

Presidente da banca:

Prof^a. Dra. Elisa Esposito

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Cristiële da Silva Ribeiro

Prof^a. Dra. Lila Missae Oyama

Prof^a. Dra. Fabiana Andréa Hoffmann Sardá

Prof. Dra. Elen Anatriello

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a três pessoas que foram fundamentais para que eu conseguisse trilhar essa jornada.

À minha filha Julia, pois sua existência me fez uma pessoa melhor, dando um novo sentido à minha vida!

Ao meu marido Alexandre, pois sem o seu incentivo eu não teria dado continuidade aos estudos acadêmicos. Você me proporcionou confiança e força.

À minha mãe, que além da educação que me proporcionou, me deu suporte em todos os momentos que precisei ficar até mais tarde, estudando ou fazendo análises, cuidando de minha filha durante as minhas ausências e sempre torcendo por mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por permitir que mais uma etapa de minha vida fosse cumprida e de proporcionar a realização de um sonho.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, pois sem eles essa pesquisa nunca teria acontecido.

A minha família, por existirem em minha vida me apoiando e me dando forças em todos os momentos difíceis, que foram muitos, e pelos momentos felizes também, que é o que faz todo o nosso esforço valer a pena.

A minha orientadora, Elisa Esposito, pelas orientações, compreensão, pelas nossas conversas descontraídas e relativas ao trabalho também. A você meu muito obrigada.

Ao meu co-orientador, Gabriel Inácio de Souza, por toda dedicação e carinho que demonstrou por esse trabalho e que contribuiu significativamente para sua execução.

Agradeço imensamente ao meu amigo Kal, do laboratório de Tecido Adiposo da UMC, que foi fundamental para que eu aprendesse a manipular os animais, e que sempre se mostrou presente para ajudar em tudo, desde a parte da experimentação animal até nas diversas análises que precisei fazer na UMC.

À minha querida amiga e técnica de laboratório Ticiane, que praticamente foi um anjo em minha vida, me ajudando e participando em todas as etapas desse doutorado. Você foi uma ajuda e tanto nesses 4 anos...

À equipe do biotério da Universidade de Mogi das Cruzes, Maurício, Douglas e Nayara, por toda a orientação e ajuda com os animais.

Ao laboratório de Metabolismo e Reprodução de Organismos Aquáticos da USP: Cris, Renato Honji, Aline, Kadu, Gabi, Paulo, Bruno, Bruno Marota e em especial à Dra. Renata que me acolheu e me ajudou muito nas análises de ácidos graxos.

Aos amigos que fiz do laboratório de Tecido Adiposo da UMC: Pamela, Franco, Magno, Marcela, Rodrigo, Kevin e Luana, que me receberam e me ajudaram nas diversas análises que lá desenvolvi e em especial ao Dr. Miguel, que permitiu que eu pudesse frequentar e aprender as técnicas das análises em seu laboratório.

Agradeço em especial ao Alexandre Aono, que foi fundamental nas análises de bioinformática para que conseguíssemos interpretar os dados de metagenômica, também por sua dedicação e disponibilidade.

Ao Dr. Gabriel Fernandes, Dra. Sara Cuadros e Dra. Julliane Dutra, do Instituto Renè Rachou – Fiocruz Minas – por terem me recebido e possibilitado o desenvolvimento da parte da metagenômica desse trabalho nessa Instituição, me dando todo o suporte necessário.

Agradeço em especial à Dra. Lila, que se mostrou sempre solícita em ajudar, pelas nossas conversas sobre o trabalho e suas recomendações pertinentes que fizeram toda a diferença.

Aos meus amigos de laboratório: Ju Lisboa, Tici, Jana, Vânia, Eduardo, Douglas, Ana Claudia, Carol, Rafael, João, Will, Camila além dos demais amigos que fiz em outros laboratórios da UNIFESP, Dayele, Fabi, Tarcísio, Dani, Ellen e Nadia que fizeram parte de momentos felizes de convivência durante o trabalho laboratorial. Obrigada por toda a ajuda!!!

À FAPESP, pelo apoio financeiro do projeto.

À CAPES, pela bolsa concedida.

EPÍGRAFE

*"O que o conhecimento faz é o mesmo que acender um fósforo
no campo no meio da noite. Um fósforo não ilumina quase nada,
mas nos permite ver quanta escuridão existe ao redor"*

William Faulkner

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	vii
ABSTRACT.....	ix
1. JUSTIFICATIVA.....	1
1.1 Recuperação do soro de leite produzido pelas indústrias queijeiras na produção do complexo coacervado de proteínas do soro de leite (Coa) e galactoligossacarídeo (Gos)	1
2. INTRODUÇÃO.....	4
2.1 Obesidade e sua Relação com a Microbiota Intestinal.....	4
2.2. A membrana plasmática e as balsas lipídicas (lipid rafts)	9
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. <i>Objetivos gerais</i>	17
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. <i>Obtenção do Coacervado de Proteínas do Soro de Leite (PSL) - Coacervação em Quitosana</i>	18
4.2. <i>Galactooligossacarídeo (Gos)</i>	19
4.3. <i>Animais e dieta</i>	19
4.4. <i>Determinação do perfil de ácidos graxos do cólon</i>	22
4.5. <i>Determinação de citocinas do tecido intestinal por ELISA</i>	23
4.6. <i>Protocolo de Western blotting para proteína TLR4 do cólon</i>	23
4.7. <i>Extração de DNA metagenômico de amostras fecais de camundongo</i>	24
4.8. <i>Construção da biblioteca de amplicons do gene 16S rRNA de Bacteria</i>	25

4.9. <i>Bioinformática</i>	26
4.10. <i>Análise Estatística</i>	27
5. RESULTADOS	28
5.1. <i>Biometria e Dietas</i>	28
5.2. <i>Perfil de Ácidos Graxos</i>	31
5.3. <i>Perfil Inflamatório no Tecido Intestinal</i>	35
5.4. <i>Determinação proteica por Western blotting – TLR4</i>	39
5.5. <i>Associação do Perfil de Ácidos Graxos e Citocinas Inflamatórias</i>	39
5.6. <i>Análise da Microbiota intestinal</i>	40
5.7. <i>Associação da Microbiota com os Parâmetros Metabólicos</i>	45
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO 01	79
ANEXO 02	80
ANEXO 03	81
ANEXO 04	83
ANEXO 05	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Interações entre os componentes da dieta com o microbioma, a modulação do sistema imune e da produção de citocinas no epitélio do cólon gerando a inflamação contribuem coletivamente para o desenvolvimento da obesidade.	06
Figura 02: Regiões conservadas (representadas em verde) e regiões variáveis (representadas em cinza) do gene 16S rRNA.....	08
Figura 03: Principais lipídeos estruturais de membranas biológicas: fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomielina e esfingosina.....	12
Figura 04: Este modelo propõe a existência de diversas balsas na membrana, que se diferem pela composição da proteína nelas presentes (diferentes balsas demonstradas em laranja, lilás e roxo). A ativação da proteína com âncora de GPI promove o agrupamento das balsas (em vermelho) promovendo a dimerização de receptores e de enzimas. O agrupamento pode ocorrer tanto extracelularmente (a), dentro da membrana (b) ou no citosol (c). Os sinais extracelulares podem também aumentar a afinidade da proteína nas balsas que podem recrutar outras proteínas, interligando outras balsas.....	14
Figura 05: Divisão dos grupos em dietas e tratamentos.....	20
Figura 06: Evolução de massa corpórea dos animais alimentados com dieta normolipídica controle (Nágua) e hiperlipídica controle (HFágua) e tratamentos (HFCoa; HFGos e HFCOAG) durante as 16 semanas de ensaio experimental.....	28
Figura 07: Média da massa relativa dos tecidos adiposos epididimal, mesentérico e retroperitoneal, expresso em g/100g de massa corporal durante as 16 semanas de tratamento.....	29
Figura 08: Média da massa relativa dos tecidos intestinais duodeno, ceco, cólon e no fígado, expresso em g/100g de massa corporal, em animais alimentados com dieta normolipídica e hiperlipídica.....	30

Figura 09: Somatória dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados totais nas classes: Esfingomielina (SM), Fosfatidiletanolamina (PE) e Fosfatidilcolina (PC) nos diferentes grupos experimentais.....	34
Figura 10: Concentração da citocina IL-1 β no duodeno, ceco e cólon nos diferentes grupos experimentais.....	35
Figura 11: Concentração da citocina IL-6 no ceco e cólon nos diferentes grupos experimentais.....	36
Figura 12: Concentração da citocina TNF- α no ceco e cólon nos diferentes grupos experimentais.....	36
Figura 13: Concentração da citocina IFN- γ no ceco e cólon nos diferentes grupos experimentais.....	37
Figura 14: Concentração da citocina IL-10 no duodeno, ceco e cólon nos diferentes grupos experimentais.....	37
Figura 15: Razão IL-10/TNF α no ceco e cólon nos diferentes grupos experimentais.....	38
Figura 16: Expressão da proteína TLR4 responsável pela via inflamatória do cólon nos diferentes grupos experimentais.....	39
Figura 17: (A) Índice de diversidade de Shannon das bactérias intestinais de animais submetidos a dieta hiperlipídica (HFágua) e normolipídica (Nágua) (B) Riqueza das bactérias intestinais de animais submetidos à dieta hiperlipídica (HFágua) e normolipídica (Nágua)	40
Figura 18: Composição média dos Filos e Classes de bactérias da microbiota intestinal de animais submetidos à dieta hiperlipídica (HFágua) e normolipídica (Nágua).....	41
Figura 19: Composição média dos gêneros de bactérias da microbiota intestinal de animais submetidos a dieta normolipídica (Nágua) e hiperlipídica tratados ou não (HFágua, HFCoa, HFGos e HFcoAG).....	42
Figura 20: Associação entre os táxons da microbiota do cólon correlacionados com as variáveis fisiológicas.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Composição nutricional do coacervado de proteínas do soro de leite.....	18
Tabela 02: Constituintes utilizados nas dietas Normolipídicas e Hiperlipídicas.....	19
Tabela 03: Perfil dos ácidos graxos nas dietas normolipídica e hiperlipídica....	19
Tabela 04: Massa corpórea e consumo alimentar em camundongos alimentados com dieta normolipídica e hiperlipídica e seus respectivos tratamentos.....	27
Tabela 05: Porcentagem dos principais ácidos graxos, atividade da dessaturase $\Delta 9$, índice lipogênico e razão n3/n6 da esfingomiellina (SM) do cólon de camundongos tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica.....	30
Tabela 06: Porcentagem dos principais ácidos graxos, atividade da dessaturase $\Delta 9$, índice lipogênico e razão n3/n6 da fosfatidiletanolamina (PE) do cólon de camundongos tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica....	31
Tabela 07: Porcentagem dos principais ácidos graxos, atividade da dessaturase $\Delta 9$, índice lipogênico e razão n3/n6 da fosfatidilcolina (PC) do cólon de camundongos tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica.....	32
Tabela 08: Correlações entre as variáveis metabólicas IL10/TNF α , 18:2n6 da classe PE e 16:1n7 da classe Pc nos diferentes grupos experimentais.....	39
Tabela 09: Abundância relativa dos gêneros de bactérias mais representativas nos grupos HFágua e HFCOAG e as porcentagens de dissimilaridade entre eles.....	42
Tabela 10: Associações entre as bactérias intestinais com as variáveis fisiológicas do cólon.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

12:0	Ácido láurico
14:0	Ácido mirístico
14:1n9	Ácido miristoleico
15:0	Ácido pentadecanoico
16:0	Ácido palmítico
16:1n7	Ácido palmitoleico
18:0	Ácido esteárico
18:1n7	Ácido vacênico
18:1n9	Ácido oleico
18:2n6	Ácido linoleico
18:3n3	Ácido α -linolênico
18:3n6	Ácido γ -linolênico
20:0	Ácido araquídico
20:3n6	Ácido di-homo- γ -linoleico
20:4n6	Ácido araquidônico
20:5n3	EPA – ácido eicosapentaenóico
22:6n3	DHA – ácido docosa-hexaenóico
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
BSA	Albumina de soro bovino
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CLA	Conjugado do ácido linoleico
Coa	Coacervado de proteína do soro de leite
CXCR4	<i>Chemokine receptor 4</i>
D Δ 5	Enzima dessaturase Δ 5
D Δ 6	Enzima dessaturase Δ 6
D Δ 9	Enzima dessaturase Δ 9
FOS	Frutooligossacarídeo

FOSHU	<i>Foods for Specifed Health Use</i>
GC	Cromatografia gasosa
GDE5	<i>Growth differentiation fator 5</i>
Gos	Galactooligossacarídeo
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HFÁgua	Dieta hiperlipídica e gavagem com água
HFCoa	Dieta hiperlipídica e gavagem com coacervado
HFCOAG	Dieta hiperlipídica e gavagem com coacervado + galactooligossacarídeo
HFGos	Dieta hiperlipídica e gavagem com galactooligossacarídeo
hsps	<i>Heat shock proteins</i>
IFN γ	Interferon γ
IKB	<i>Inhibitor of kappa B</i>
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
LPS	Lipopolissacarídeo
MUFA	Ácido Graxo monoinsaturado
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NÁgua	Dieta normolipídica e gavagem com água
NDO	<i>Non Digestible Oligosaccharides</i>
NF-kB	<i>Nuclear fator kappaB</i>
OTU	Unidade taxonômica operacional
PC	Fosfatidilcolina
PCI	Prostaciclina
PE	Fosfatidiletanolamina
PGE	Prostaglandina E
PKC	Proteína quinase C
PPAR γ	Receptor γ ativado por proliferador de peroxissomos
PUFA	Ácido Graxo polinsaturado

PUFA n3	Ácido Graxo polinsaturado ômega 3
PUFA n6	Ácido Graxo polinsaturado ômega 6
RF39	Tenericutes; Ordem RF39
Σ TAB	Soma Tecido Adiposo Branco
S24-7	Bacteroidetes; Família S24-7
SFA	Ácido graxo saturado
TAE	Tecido adiposo epididimal
TAM	Tecido adiposo mesentérico
TAR	Tecido adiposo retroperitoneal
TLR4	Receptor <i>tool like</i> 4
TNFα	Fator de necrose tumoral α
TRAF6	<i>TNF receptor-associated fator</i> 6
TXA	Tromboxano A
YS2	Cyanobacteria; Ordem YS2
β-Lg	β-lactoglobulina

RESUMO

Produtos derivados do soro de leite, como o Coacervado de proteínas do soro de leite (Coa), galactooligossacarídeo (Gos) e ambos associados (COAG) foram testados em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica com o objetivo de verificar mudanças no perfil lipídico estrutural dos enterócitos, na inflamação e na composição da microbiota intestinal durante a obesidade. Foram utilizados camundongos machos C57BL/6, submetidos às dietas normolipídicas e hiperlipídicas, divididos em cinco grupos experimentais: 1) Controle Normolipídico (Nágua), 2) Controle Hiperlipídico (HFágua), 3) Dieta hiperlipídica + Coa (HFCoa), 4) Dieta hiperlipídica + Gos (HFGos) e 5) Dieta hiperlipídica Coa + Gos (HFCOAG), que receberam tratamento durante 16 semanas. Amostras de fezes foram coletadas no final do experimento e imediatamente congeladas em criotubos para análise de metagenômica. O intestino foi dividido em suas porções: duodeno, ceco e cólon, congelados em criotubos até a data de processamento para dosagem das citocinas inflamatórias, avaliação da expressão proteica de TLR4 e do perfil dos ácidos graxos das principais classes de membrana: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e esfingomielina (SM). Os dados biométricos mostraram que os grupos HCoa e HFCOAG mantiveram o mesmo ganho de massa corpórea que o controle saudável e somente o HFCOAG apresentou diminuição da adiposidade e eficiência energética comparado ao HFágua. As diferentes dietas influenciaram na diversidade e composição da microbiota intestinal. Dentre os tratamentos, a composição da microbiota do grupo HFCOAG ficou mais próxima do controle saudável demonstrando altas porcentagens de dissimilaridade para bactérias representantes do estado saudável como as Lachnospiraceae e *Porphyromonas* e apresentou o táxon RF39 como assinatura microbiana. O grupo HFCoa apresentou a melhor atividade anti-inflamatória no ceco (IL-10/TNF α). No cólon, o grupo HFGos apresentou diminuição de IL-1 β com aumento expressivo do IFN γ , que correlacionou-se positivamente com o gênero *Bilophila* sugerindo uma influência desse táxon na produção de IFN γ . A concentração de ácido vacênico (18:1n7) na classe SM da membrana do cólon aumentou em todos os tratamentos e isso pode estar relacionado com a instabilidade das balsas lipídicas que ativam os receptores TLR4, que apesar de não demonstrado diferença na sua expressão infere-se uma menor ativação uma vez que foi constatada uma diminuição do IL-6 nesse tecido. O

tratamento HFCOAG aumentou as porcentagens do ácido vacênico e ácido miristoleico (14:1n9) na classe SM demonstrando correlações desses ácidos graxos associados a uma melhor atividade anti-inflamatória no cólon. O aumento observado do ácido vacênico foi correlacionado ao táxon *Mogibacteriaceae*. O tratamento HFGos aumentou o ácido palmitoleico (16:1n7) na classe PC, que se correlacionou negativamente com a atividade anti-inflamatória no cólon. De uma forma geral, ficou claro que a dieta influencia diretamente no perfil da microbiota intestinal durante a obesidade e consequentemente nas respostas metabólicas associadas. A associação COAG apresentou a melhor resposta preventiva diante das mudanças típicas da obesidade, todavia mais estudos são necessários para avaliar outros aspectos metabólicos nos diferentes tecidos e no desenvolvimento desse composto que poderá ser utilizado futuramente como um profilático contra a obesidade.

Palavras chave: Obesidade, prebióticos, microbiota intestinal, inflamação, balsas lipídicas.

ABSTRACT

Whey protein products such as Coacervate whey protein (Coa), galactooligosaccharide (Gos) and both associated (COAG) were tested in mice fed with a high fat diet to verify changes on enterocyte structural lipid profile, inflammation and intestinal microbiota composition during obesity. Males C57BL/6 were fed normolipid and high fat diets, divided into five experimental groups: 1) Normolipid control (Nwater), 2) High fat control (HFwater), 3) High fat + Coa (HFCoa), 4) High fat + Gos (HFGos) and 5) High fat Coa + Gos (HFCOAG), for 16 weeks treatment. Stool samples were collected at the end of the experiment and frozen in cryotubes for metagenomic analysis. The intestine was divided in: duodenum, cecum and colon, frozen in cryotubes until the processing data for cytokine dosage, evaluation of TLR4 protein and the main classes of fatty acid profile: phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) and sphingomyelin (SM). The biometric data showed that HFCoa and HFCOAG groups maintained the same body mass gain as normolipid control, but only HFCOAG decreased adiposity and energy efficiency compared HFwater. The different diets changed the gut microbiota. Among treatments, the composition of the HFCOAG gut microbiota was closer to normolipid control group showing high percentages of dissimilarity for healthy state bacteria such as Lachnospiracea and *Porphyromonas* and the taxon RF39 as microbial signature. HFCoa group showed the best anti-inflammatory activity in the cecum (IL / 10 / TNF α). HFGos group decreased IL-1 β with concomitant high levels of IFN γ , which correlated positively with *Bilophila* genus suggesting an influence of this taxon on IFN γ production. The percentage of vaccenic acid (18: 1n7) in the SM class of colon membrane increased in all treatments showing its possible relation with lipid raft instability on TLR4 activation. TLR4 receptors showed no difference in its expression, but changes on its activation is inferred since a decrease of the IL-6 was observed in this tissue. HFCOAG treatment increased vaccenic and myristoleic acid (14: 1n9) in SM class demonstrating correlations with an improvement of anti-inflammatory activity in colon. The increase of vaccenic acid was correlated to the Mogibacteriaceae taxon. HFGos treatment increased palmitoleic acid (16: 1n7) in PC class, which was negatively correlated with an anti-inflammatory activity in colon. In general, there was a clear diet influence that directly promotes changes in gut microbiota profile and alters metabolic response during obesity as

consequence. COAG showed the best preventive response among treatments in this research, but more studies are necessary to evaluate other metabolic aspects in different tissues and on the development of this compound that may be used as a prophylactic against obesity in the future.

Keywords: Obesity, prebiotics, gut microbiota, inflammation, lipid rafts.

1. JUSTIFICATIVA

1.1 *Recuperação do soro de leite produzido pelas indústrias queijeiras na produção do complexo coacervado de proteínas do soro de leite (Coa) e galactoligossacarídeo (Gos)*

Há poucas décadas, o processo de transformação do leite em produtos lácteos não levava em consideração os impactos ambientais e sociais associados, permitindo constantemente o surgimento de problemas que, cada vez mais, tornam-se críticos para o bem estar da sociedade, como a miséria e a pobreza, o desemprego, a devastação de solos produtivos, a poluição das águas e do ar, entre outros (SANCHES, 1997). As indústrias de queijo são exemplos de empresas que geram resíduos de grande impacto ambiental. O soro de leite é um subproduto da fabricação de queijo e do processo de obtenção da caseína constituindo-se em um líquido opaco, amarelo esverdeado, que contém cerca de 55% dos sólidos existentes no leite integral original e representa cerca de 80 a 90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijo. Assim, devido sua alta carga orgânica, pode-se então ter sérios problemas de ordem ambiental a partir do descarte do mesmo em locais inadequados.

De acordo com suas propriedades, o soro de leite é constituído de 93% de água sendo o restante sua massa seca (7%). Dessa massa seca, 67% é lactose, 12% proteínas, 9% minerais, 8% ácido láctico e 5% de lipídeos. Suas proteínas possuem elevado valor nutricional, devido ao seu conteúdo em aminoácidos essenciais e apresentam conformações globulares compactas que lhes conferem propriedades funcionais próprias (ZUÑIGA, 2003).

Diante da grande preocupação destinada à essa alta carga orgânica presente no soro, vários trabalhos foram e estão sendo realizados para recuperar suas propriedades e assim minimizar o impacto ambiental gerado por esse subproduto das indústrias queijeiras. Em pesquisas anteriores realizadas pelo nosso grupo de laboratório, foi possível implementar uma técnica simples e de baixo custo, para recuperar as principais proteínas do soro de queijo/leite, aproveitando o subproduto ao invés de descartá-lo. Essa técnica, chamada de coacervação de PSQ (proteínas do soro de queijo) possibilita a retirada de peptídeos presentes nesse soro com

potente atividade biológica, como a α -lactalbumina, β -lactoglobulina e a lactoferrina (DE SOUZA et al., 2014).

Para exercer os seus efeitos fisiológicos *in vivo*, esses peptídeos bioativos precisam alcançar seus locais de destino no lado luminal do trato intestinal ou em órgãos periféricos específicos após a absorção (HARTMANN; MEISEL, 2007; NAGPAL et al., 2011). Há evidências consideráveis que as proteínas intactas e fragmentos peptídicos podem entrar na circulação do sangue para atingir níveis fisiologicamente importantes. No entanto, alguns peptídeos exibem a bioatividade *in vitro*, mas são ineficazes *in vivo*, o que sugere uma degradação gastrointestinal (MILLS; ALCOCER; MORGAN, 1992; ABUBAKAR et al., 1998; SAITO et al., 2000; VERMEIRSEN et al., 2002; ROUFIK; GAUTHIER; TURGEON, 2006). Finalmente, para as PSQ estimularem e/ou modularem vias fisiológicas, como, por exemplo, a síntese de glutathione ou até mesmo atuarem como imunomoduladores, devem permanecer em suas formas nativas intactas, preservando, desta maneira, a atividade biológica original que deve ser transferida aos peptídeos resultantes da hidrólise intestinal (PACHECO et al., 2005). Desta forma, a eficácia de tais produtos na prevenção de doenças baseia-se em preservar a biodisponibilidade intestinal desses ingredientes ativos.

Testes já foram efetuados por nosso grupo de pesquisa utilizando os peptídeos extraídos do soro pela técnica de coacervação, produto este denominado de Coacervado (Coa), em camundongos submetidos à dieta hiperlipídica para indução da obesidade e o Coa se mostrou um tratamento eficiente na redução da massa corporal, dos níveis do perfil lipídico sérico acompanhado da diminuição da insulina e LPS (lipopolissacarídeo) (MORENO et al., 2014). Dessa forma, foi possível obter um produto (Coa), que revelou ser um composto nutracêutico na prevenção da obesidade. O alvo dos nutracêuticos é significativamente diferente dos alimentos funcionais, pois os nutracêuticos são utilizados para prevenção e tratamento de doenças enquanto que os alimentos funcionais devem estar na forma de alimento comum e associada apenas a redução do risco da doença, e não à prevenção ou tratamento (KWAK; JUKES, 2001).

Entretanto, o soro remanescente gerado no processo de coacervação ainda é considerado poluente por possuir elevada concentração de lactose e de micronutrientes que poderiam ser ainda utilizados. Como alternativa para o uso

desse remanescente do soro, pensou-se em produzir o galactooligossacarídeo (Gos), que é gerado a partir de substratos ricos em lactose.

A conversão da lactose em GOS por ação da enzima β -galactosidase é uma reação cineticamente controlada e responde a um modelo de competição entre a reação de transgalactosilação e hidrólise, podendo utilizar células viáveis a partir da fermentação de substratos ricos em lactose, bem como fazer uso de β -galactosidase extraída previamente (BICAS et al., 2010; PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

O galactooligossacarídeo (GOS) está incluído entre os oligossacarídeos não digeríveis (NDO, *Non Digestible Oligosaccharides*) e licenciado como aditivo de alimentos FOSHU (*Foods for Specified Health Use*) pelo Ministério da Saúde do Japão. Estão disponíveis comercialmente em países como o Japão, na forma líquida ou em pó; em uma mistura contendo oligossacarídeos, lactose, glicose e galactose (TOMAL et al., 2010). É considerado um prebiótico, pois aumenta a colonização de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp, espécies consideradas benéficas ao hospedeiro.

Os compostos denominados prebióticos, foram reconhecidos por sua capacidade de manipular a composição da microbiota intestinal em benefício do hospedeiro. (GIBSON; ROBERFROID, 1994). Atualmente o termo prebiótico passou por uma revisão de seu conceito, por especialistas do *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*, uma associação formada por pesquisadores do mundo todo, sem fins lucrativos, dedicado ao avanço científico de excelência dos probióticos e prebióticos. Dentre as mudanças, o termo prebiótico passou a ser considerada qualquer substância seletivamente utilizada pelas bactérias intestinais, que promova evidências benéficas e que não sejam degradadas pelas enzimas do hospedeiro (GIBSON et al., 2017).

Já é fato observado de que o diversificado ecossistema microbiano que habita a mucosa intestinal fornece evidências de que a mudança de determinadas populações microbianas, via intervenções dietéticas, podem alterar o metabolismo melhorando a saúde do hospedeiro ou no tratamento de doenças (DAVID et al., 2014). O Gos é fermentado por bactérias-chave intestinais na manutenção do estado saudável. Os subprodutos da fermentação do Gos, podem alterar o ambiente intestinal, através da redução do pH colônico, alterações na população bacteriana e permeabilidade intestinal, reduzindo assim, a migração de lipopolissacarídeo (LPS) para a circulação. Esses subprodutos podem passar para a circulação e ajustar

nosso sistema imunológico de forma a prevenir distúrbios inflamatórios observados na obesidade.

Segundo essas informações, a presente pesquisa se propõe a investigar a ação dos produtos derivados do soro de leite, o Coa e o Gos isoladamente e também associados (COAG), na prevenção da obesidade, se apoiando em dois aspectos principais: ambiental e nutricional. O primeiro, relacionado à crescente preocupação em reduzir a carga orgânica poluidora do soro de queijo/leite, lançado como efluente em lagoas de tratamento pelas indústrias queijeiras, apesar do enorme valor deste subproduto, rico em proteínas, lactose e outros materiais orgânicos. E como segundo aspecto, a proposta de recuperar essa elevada carga orgânica presente no soro de queijo/leite produzindo um composto nutracêutico (Coa) e um prebiótico (Gos), utilizados como tratamentos na prevenção da obesidade. É importante salientar que nessa pesquisa será testado o Gos de origem comercial, o que nos garantirá resultados fiéis devido ao seu teor de pureza. O objetivo é que futuramente possamos utilizar o Gos proveniente do soro de leite uma vez que os processos de sua produção e purificação estão ainda na fase de desenvolvimento pelo nosso grupo de laboratório.

2. INTRODUÇÃO

2.1 Obesidade e sua Relação com a Microbiota Intestinal

A obesidade tornou-se um dos problemas de saúde pública mais prevalente da atualidade. Mais mortes são causadas pelo excesso de peso do que por indivíduos abaixo do peso. A obesidade é uma condição multifatorial, mas pode ser simplesmente descrita como um desbalanço a longo prazo da ingestão e o gasto de energia (VIERO; FARIAS, 2010).

Segundo relatório da OMS, em adultos, o excesso de peso e a obesidade atingiram 56,9% e 20,8% da população mundial em 2013, respectivamente. Dados mais recentes mostram que o número de jovens obesos, com idade de cinco a 19 anos, aumentou mais dez vezes nas últimas quatro décadas, passando de 11 milhões em 1975 para 124 milhões em 2016 segundo estudo da *Imperial College London* e da Organização Mundial da Saúde (OMS). No Brasil, o Ministério da

Saúde revela que o sobrepeso afeta a 54% da população brasileira e quase 20% dos homens e 24% das mulheres estão obesas.

A obesidade não é um mero problema de peso, estética ou diminuição funcional, mas representa um aumento importante do risco para doenças cardiometabólicas, pelo menos quando tem um componente significativo de gordura visceral. Quando esta se associa a resistência à insulina, dislipidemia (hipertrigliceridemia, aumento da concentração de ácidos graxos livres, diminuição da concentração HDL) e/ou hipertensão, passa de obesidade simples para a síndrome metabólica (MONTEIRO; AZEVEDO, 2010).

Os hábitos alimentares e o sedentarismo são os maiores contribuintes para o desenvolvimento da obesidade, porém uma questão que surgiu recentemente foi entre a composição e funcionalidade dos microrganismos do intestino que estão relacionadas ao processo obesogênico. (CLARKE et al., 2012) (Figura 01).

O relacionamento e a constituição entre hospedeiro e microrganismos coevoluíram ao longo do tempo em uma relação mutuamente benéfica ou tolerante, que se manifesta praticamente em todas as formas de vida. Em humanos e mamíferos, essa seleção não ocorre de forma aleatória e sim dependente dos diversos fatores presente no hospedeiro, do ambiente e a interação estabelecida entre os próprios microrganismos. Uma vez desenvolvido, a microbiota intestinal torna-se um órgão essencial que desempenha inúmeras funções para o hospedeiro. No entanto, a natureza e estabilidade fundamental desenvolvida evolutivamente desta relação entre hospedeiro e microrganismo estão sendo agora ameaçadas por mudanças drásticas no ambiente, dieta e estilo de vida, os quais certamente remodelaram o microbioma intestinal humano, nos últimos 100 anos (SUN; CHANG, 2014).

Recentemente tem se estudando a composição de micro-organismos intestinais de pessoas saudáveis e obesas e os resultados são surpreendentes. O trato gastrointestinal humano é colonizado por várias centenas de espécies diferentes de bactérias comensais, referidas como microbiota, que atinge densidades de 10¹² bactérias por grama de conteúdo luminal no cólon. As principais alterações na microbiota estão associadas a uma série de distúrbios intestinais, incluindo doença intestinal inflamatória, síndrome do intestino irritável, doença autoimune, diabetes e câncer colo retal (ROSSI et al., 2016).



Figura 01: Interações entre os componentes da dieta com o microbioma, a modulação do sistema imune e da produção de citocinas no epitélio do cólon gerando a inflamação contribuem coletivamente para o desenvolvimento da obesidade. Adaptado de (ZHU et al., 2013).

Esses distúrbios se instalam quando a composição microbiológica do intestino se encontra desequilibrada, pois interfere no rendimento de energia, aquisição de nutrientes e outras vias metabólicas do organismo (DEVARAJ; HEMARAJATA; VERSALOVIC, 2013).

O cólon humano saudável abriga grande diversidade de microrganismos. Alguns autores relacionam obesidade com predominância do filo Firmicutes e estado saudável, com o filo Bacteroidetes (LEY et al., 2005; GOYAL et al., 2015). Entretanto, a medida que o conhecimento nesta área avança, percebemos que existem microrganismos indicadores de estado saudável e que atuam diretamente modulando o sistema imuno-metabólico e outros associados a um quadro de doença. Muitos desses micro-organismos considerados benéficos pertencem justamente ao filo Firmicutes com um papel relevante na conversão de acetato em butirato (NEPELSKA et al., 2012).

As principais mudanças fisiológicas decorrentes da alteração da microbiota que possuem papel fundamental nessa relação entre microrganismo e obesidade são os observados no padrão dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos pela fermentação bacteriana e a presença dos lipopolissacarídeos (LPS) componentes da parede celular das bactérias gram-negativas. Dentre os AGCC, três

deles estão envolvidos na obesidade: butirato, propionato e acetato, sendo que butirato e propionato são predominantemente antiobesogênicos (RIVIÈRE et al., 2016). Butirato é conhecido como a maior fonte de energia para os colonócitos, aumenta a atividade mitocondrial, aumenta a sensibilidade à insulina, possui potencial anti-inflamatório e aumenta a função da barreira intestinal. Propionato é conhecido por inibir síntese de colesterol e inibindo a expressão de resistina nos adipócitos (CHAKRABORTI, 2015).

O lactato, embora não seja um AGCC, também é produzido por alguns membros da microbiota, como lactobacilos, bifidobactérias e proteobactérias, mas em condições fisiológicas normais não se acumulam no cólon devido à presença de algumas espécies, como *Eubacterium hallii*, que pode converter o lactato em outros AGCC menos relevantes (RÍOS-COVIÁN et al., 2016).

O LPS por sua vez está associado à endotoxemia metabólica prejudicando o metabolismo da glicose e induzindo inflamação a partir de mecanismos dependentes de ativação dos *tool like receptors* (TLR) (CAESAR et al., 2015). Os mecanismos de funcionamento da via da família TLR já são amplamente conhecidos na resposta contra padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) na ativação do sistema imune inato. A via TLR4, em especial, pode ser modulada por ácidos graxos saturados (ativação) e pelo LPS, que, quando ativado, leva a uma reação em cascata intracelular com ativação do MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), TRAF 6 (*TNF receptor-associated factor 6*), IKB (*Inhibitor of kappa B*) e ativação do NF-κB (*nuclear factor kappaB*) gerando a transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral α (TNFα), interferon γ (IFNγ), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) (BRESLIN et al., 2007).

Em modelos genéticos e de obesidade induzida por dieta demonstraram um aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNFα, IFNγ, IL-1 e IL-6 (BRUN et al., 2007; CANI; DELZENNE, 2007; KIM et al., 2012). A produção destas citocinas é deletéria para a ação da insulina no músculo e fígado, pois ativam enzimas serina/treonina cinases, que fosforilam o receptor de insulina, tornando-os inativos (HOTAMISLIGIL et al., 1996). A exposição prolongada ao LPS faz a resistência à insulina se instalar primeiro no fígado e depois nos músculos, o tecido que mais consome energia no corpo. Só mais tarde ela atinge o tecido adiposo. Por isso o corpo acumula gordura. A glicose não usada pelo fígado e pelos músculos permanece no sangue e é absorvida pelo tecido adiposo. As células desse tecido

recebem glicose e a estocam como gordura durante muito tempo antes de se tornarem resistentes à insulina (ZORZETTO e RIBEIRO, 2012).

A possível existência de uma ligação entre a obesidade e a microbiota intestinal só se tornou visível após desenvolvidas técnicas de sequenciamento de DNA em larga escala que pudesse analisar a microbiota total do intestino, incluindo aquelas bactérias incultiváveis em laboratório, uma vez que os principais obstáculos no estudo de comunidades microbianas eram que mais de 99% dos microrganismos não podem ser cultivados (HANDELSMAN, 2005).

Para identificar a composição dos microrganismos do intestino, a técnica de identificação genotípica mais utilizada é a comparação da sequência do gene 16S rRNA da bactéria de interesse com as espécies já identificadas (CLARRIDGE; ALERTS, 2004). Esse gene possui regiões hiperconservadas e variáveis intercaladas ao longo de sua sequência (Figura 02). As regiões conservadas são quase idênticas dentre os organismos, enquanto as outras variam proporcionalmente a proximidade filogenética entre as espécies. O alto índice de conservação de algumas regiões permitiu o desenvolvimento de *primers* universais que possibilitam o isolamento dos genes da amostra. As regiões mutáveis são usadas como parâmetros de identificação dos organismos. Os genes são isolados, amplificados a partir de PCR, e depois sequenciados (NIKOLAKI; TSAMIS, 2013). Para dois micro-organismos serem considerados da mesma espécie, deve haver mais de 99% de identidade entre as sequências de 16S rRNA. Entre gêneros, a identidade deve estar entre 97 e 99%. Para a classificação de uma espécie como sendo potencialmente nova, o nível de identidade deve ser menor do que 97% comparado às espécies já existentes (DRANCOURT; BERGER; RAOULT, 2004).



Figura 02: Regiões conservadas (representadas em verde) e regiões variáveis (representadas em cinza) do gene 16S rRNA. Modificado de ANDRIGHETTI, (2015).

Com as novas ferramentas de sequenciamento, foi possível acumular uma grande quantidade de dados genômicos de determinado ambiente. Dessa forma, a

metagenômica surgiu como um processo que revolucionou a caracterização e funcionalidade de diversos ambientes.

Metagenômica é o campo da genômica que estuda os genomas de comunidades microbianas presentes em um determinado habitat, baseado no DNA extraído de um ambiente sem a necessidade de cultivo dos microrganismos (HANDELSMAN, 2005). Isso impulsionou a ampliação dos conhecimentos relativos à composição da microbiota intestinal e ajudou a compreender e identificar as substâncias adicionais que influenciam a colonização de determinadas bactérias, expandindo assim o nosso conceito de prebióticos.

2.2. A membrana plasmática e as balsas lipídicas (lipid rafts)

Estudos iniciais sobre a influência da dieta nas membranas plasmáticas foram conduzidos em 1985, durante o processo de envelhecimento em ratos alimentados com baixo PUFA/SFA (razão polinsaturado/ saturado) e com alto PUFA/SFA e os autores sugeriram que a composição da membrana plasmática pode variar com a dieta, idade, tipo de célula e estado fisiológico (CLANDININ et al., 1985).

A membrana plasmática é a primeira interface no balanço homeostático entre as influências exógenas (como a dieta) e o controle endógeno da célula através da biossíntese ou da utilização de substratos variados. É interessante destacar que, se o balanço dos ácidos graxos da dieta modula a composição da membrana plasmática, então existe uma provável mudança no controle funcional da célula. Alterações nas propriedades físicas da membrana podem influenciar na resposta mediada por hormônios em amplos tipos celulares, como no fígado e tecido adiposo (CLANDININ et al., 1991).

O esqueleto básico de todas as membranas é uma dupla camada de moléculas de lipídeos. Existe uma variedade de moléculas de lipídeos, todos possuindo uma propriedade crítica: um lado da molécula é solúvel em água e é quimicamente descrito como hidrofílico; o outro lado é um hidrocarbono, que é portanto oleaginoso insolúvel em água e quimicamente descrito como hidrofóbico (BRETSCHER, 1973).

O mais comum dos lipídeos de membrana pertence à classe chamada de fosfolipídeos. Eles têm uma cabeça com um grupo hidrofílico composto de um fosfato ligado a um resíduo que pode ser colina, etanolamina, serina ou inositol. Em

uma membrana natural se esperaria encontrar os vários tipos de fosfolipídeos distribuídos aleatoriamente nos dois lados da bicamada; mas em 1972 descobriu-se que a distribuição é muito mais ordenada (BRETSCHER, 1973).

Na membrana plasmática das hemácias descobriu-se que a monocamada externa inclui somente fosfatidilcolina e sua parente esfingomielina, dois fosfolipídeos que contêm colina. Em contraste, a monocamada interna possui fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina. Acredita-se que fosfatidilinositol também se localiza na camada citoplasmática da membrana (figura 10) (ZWAAL et al., 1975).

Além dos fosfolipídeos, outros, dois tipos de lipídeos se encontram nas membranas das células animais: glicolipídeos e colesterol. A molécula de glicolipídeo tem uma cauda hidrofóbica similar a da esfingomielina. Glicolipídeos são apenas uma pequena fração dos lipídeos na membrana, e eles ficam confinados na camada externa. Colesterol, por outro lado é, junto com os fosfolipídeos, um lipídeo de membrana importante. Ele é uma molécula grande, em forma de disco, com quatro anéis de carbono fundidos, que dão a molécula sua estrutura rígida. Um lado do colesterol é hidrofílico, mas o resto é hidrofóbico e fica embebido na parte hidrofóbica da membrana plasmática. O número de moléculas de fosfolipídeos e de colesterol é aproximadamente o mesmo na membrana plasmática de células eucarióticas. A adição de colesterol à matriz de fosfolipídeos faz a membrana ficar menos flexível e até mesmo menos permeável (BRETSCHER, 1973; SIMONS; VAN MEER, 1988).

Dentre os fosfolipídeos, a fosfatidilcolina é a primeira maior classe e se apresenta majoritariamente distribuída na monocamada externa. Fosfatidilcolinas naturais apresentam uma cabeça polar constituída por um grupo fosfocolina. Estes fosfolipídios também possuem duas cadeias de ácidos graxos de extensão similar. A cadeia apolar ligada ao carbono 1' do glicerol apresenta-se geralmente saturada, enquanto que a cadeia ligada ao carbono 2' costuma possuir insaturações. A principal função das fosfatidilcolinas é manter a estrutura e organização das membranas celulares (OHVO-REKILÄ et al., 2002). Participam também da sinalização celular, atuando como um reservatório de mensageiros lipídicos secundários. As fosfatidilcolinas são fontes de lipídios bioativos como diacilgliceróis, fatores de ativação plaquetária, ácido aracdônico, ácido lisofosfatídico e ácido fosfatídico (FIELDING; FIELDING, 2002).

A fosfatidiletanolamina possui em sua cabeça polar um grupo amino livre, e ocupa menos espaço em relação às cadeias de ácidos graxos. A relação entre as áreas ocupadas pela cabeça polar e as cadeias hidrofóbicas da fosfatidiletanolamina proporciona ao aminofosfolípido o formato de um cone. Os aminofosfolípidos possuem a tendência de formar estruturas não lamelares, porém, quando são forçados em uma estrutura planar, como em uma bicamada, distribuem-se preferencialmente na monocamada interna. Nestas condições, a pressão intrínseca na parte hidrofóbica da membrana é aumentada (BRETSCHER, 1972; ROTHMAN; LENARD, 1977; EPAND, 1998).

Os esfingolípídeos podem ser considerados a segunda maior classe de lipídeos de membrana. Os esfingolípídeos não contêm glicerol, seu esqueleto é formado por uma aminoálcool de cadeia longa chamado esfingosina. As moléculas mais simples deste grupo são as ceramidas precursoras das esfingomielinas e glicosfingolípídeos.

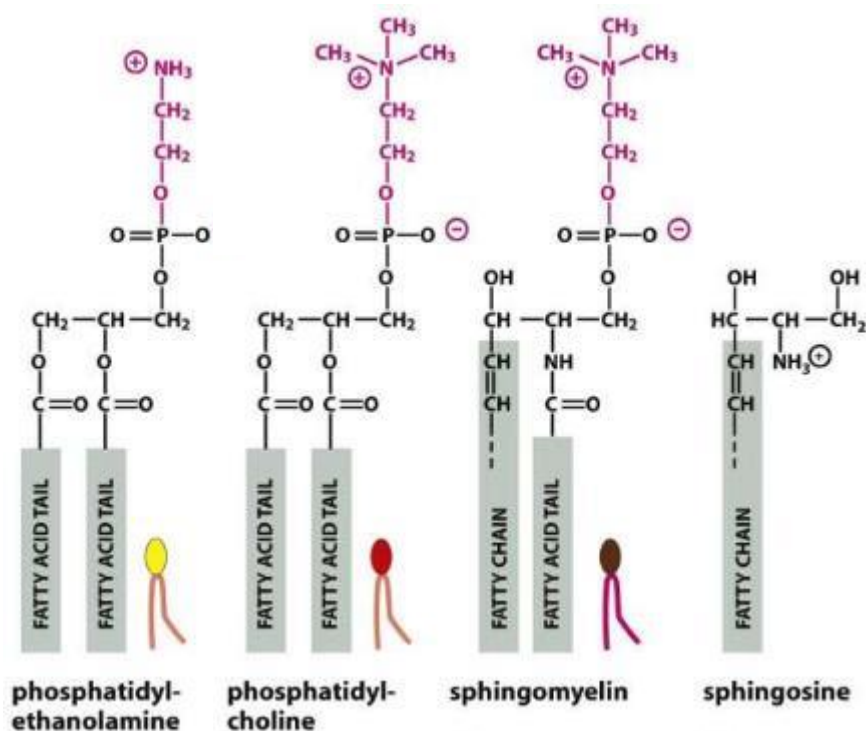


Figura 03: Principais lipídeos estruturais de membranas biológicas: fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, esfingomielina e esfingosina. Adaptado de Alberts et al., 2008 (Molecular Biology of the Cell © Garland Science).

Os lipídeos distribuídos pela membrana plasmática não se encontram na forma estática, fixados em um determinado ponto, eles apresentam movimentos nos

sentidos horizontal, vertical, além de poder trocar de camada através de um movimento conhecido como *flip-flop* (translocação transmembrana) (GURTOVENKO; ANWAR, 2009).

A membrana plasmática é a primeira interface entre as influências exógenas como a dieta e o controle endógeno da utilização desses substratos numa tentativa de garantir o balanço homeostático. A dieta hiperlipídica desencadeia mudanças iniciais em nível dos enterócitos, pois a disponibilidade dos ácidos graxos pela dieta promove alteração na composição estrutural dos lipídeos de membrana. Consequentemente, essa variação do perfil lipídico da membrana pode alterar a função celular pela modificação das reações catalíticas que ocorrem nos receptores das membranas interferindo nas respostas associadas aos receptores como a síntese de produtos metabólicos (CLANDININ et al., 1991). Além disso, a composição dos ácidos graxos nas membranas alteradas pela dieta podem também modular a produção de eicosanóides e o gasto de energia.

Estudos recentes demonstraram que altas concentrações de esfingomielina e outros esfingolipídeos presentes nas membranas plasmáticas podem ser resultantes do padrão da dieta. O aumento da disponibilidade da esfingomielina nas membranas faz com que esta seja mais facilmente recrutada para degradação, gerando a esfingosina como produto, sendo este um potente inibidor da proteína quinase C (PKC), levando a modificações na transdução de sinais e de todos os eventos dependentes dessa enzima (MERRILL; STEVENS, 1989).

A composição dos lipídeos e do colesterol nas membranas também reflete o metabolismo endógeno dos ácidos graxos. A quantificação de determinados ácidos graxos presentes na constituição da biomembrana é um reflexo na atividade das enzimas dessaturases, podendo estar associadas ou não ao padrão da dieta e consequentemente à obesidade. As dessaturases estão envolvidos na síntese de ácidos graxos mono e polinsaturados. As dessaturases $\Delta 9$ (D $\Delta 9$), $\Delta 6$ (D $\Delta 6$) e $\Delta 5$ (D $\Delta 5$) inserem uma dupla ligação em posições específicas na cadeia de ácido graxo. A D $\Delta 9$ sintetiza o ácido palmitoleico (16:1n7) e o ácido oleico (18:1n9) a partir do ácido palmítico (16:0) e ácido esteárico (18:0) respectivamente. As D $\Delta 5$ e D $\Delta 6$ catalisam a síntese de PUFA's n6 e n3. O cálculo da estimativa das D $\Delta 9$, D $\Delta 6$ e D $\Delta 5$ através da razão 16:1n7/16:0; 18:3n6/18:2n6 e 20:4n6/20:3n6 respectivamente são utilizadas para determinar a verdadeira atividade dessas enzimas. Os altos

valores das DΔ9 e DΔ6 e a diminuição da DΔ5 estão associadas à obesidade e síndrome metabólica (VESSBY et al., 2002)

Uma outra perspectiva importante que surgiu no estudo de biomembranas foi a formulação da hipótese dos *lipid-rafts* (balsas lipídicas) entre as décadas de 1980~1990 (SIMONS; VAN MEER, 1988; SIMONS; IKONEN, 1997). As balsas lipídicas são microdomínios presentes nas membranas plasmáticas e servem de plataformas para facilitar a associação de moléculas sinalizadoras com os receptores, possibilitando uma maior interação entre as moléculas e a célula. Estes microdomínios de membrana são caracterizados como estruturas pequenas e altamente dinâmicas, contendo uma alta concentração de esfingomiéline e colesterol, insolúveis no detergente Triton X- 100 a 4°C (LINGWOOD et al., 2009). A grande maioria das esfingomielinas encontradas nas balsas de membrana apresenta caudas de ácidos graxos predominantemente saturadas, o que possibilita uma interação forte e intercalada com moléculas de colesterol, fazendo com que essas regiões apresentem um grau de fluidez menor do que a membrana celular adjacente, que é constituída principalmente por fosfolipídios de cadeia insaturada (SIMONS; TOOMRE, 2000).

Essa interação entre colesterol e esfingomiéline também explica a característica única de formar um estado na membrana chamado de fase líquida ordenada (L_o phase), subdomínios estes que originam as balsas lipídicas. A L_o phase se caracteriza por apresentar uma alta ordenação de um sólido mas com alta mobilidade de translação de um líquido (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008).

Ao contrário dos fosfolipídeos de membrana, os lipídeos polares das balsas lipídicas são predominantemente acetilados com ácidos graxos saturados, que facilita a formação da fase líquida ordenada da balsa. As balsas lipídicas das células do intestino são constituídas predominantemente por glicolipídeos, perfazendo um total de 30%, além da esfingomiéline e colesterol, com 10% e 5% respectivamente (HANSEN et al., 2001).

Os *lipid-rafts* ancoram diversas proteínas envolvidas com transporte membranar, transdução de sinais e adesão celular, sendo esta uma de suas funções mais marcantes quando falamos de sinalização celular (SIMONS; VAN MEER, 1988; BROWN; ROSE, 1992; SIMONS; IKONEN, 1997). Entre as proteínas que podem se associar às plataformas lipídicas, citamos, por exemplo, proteínas com âncora de

glicosilfosfatidilinositol - GPI (Figura 04) e tirosinas cinases (receptor de insulina) (SIMONS; IKONEN, 1997). Até hoje, mais de 200 proteínas foram descritas como associadas preferencialmente em regiões de *rafts* (FOSTER; DE HOOG; MANN, 2003).

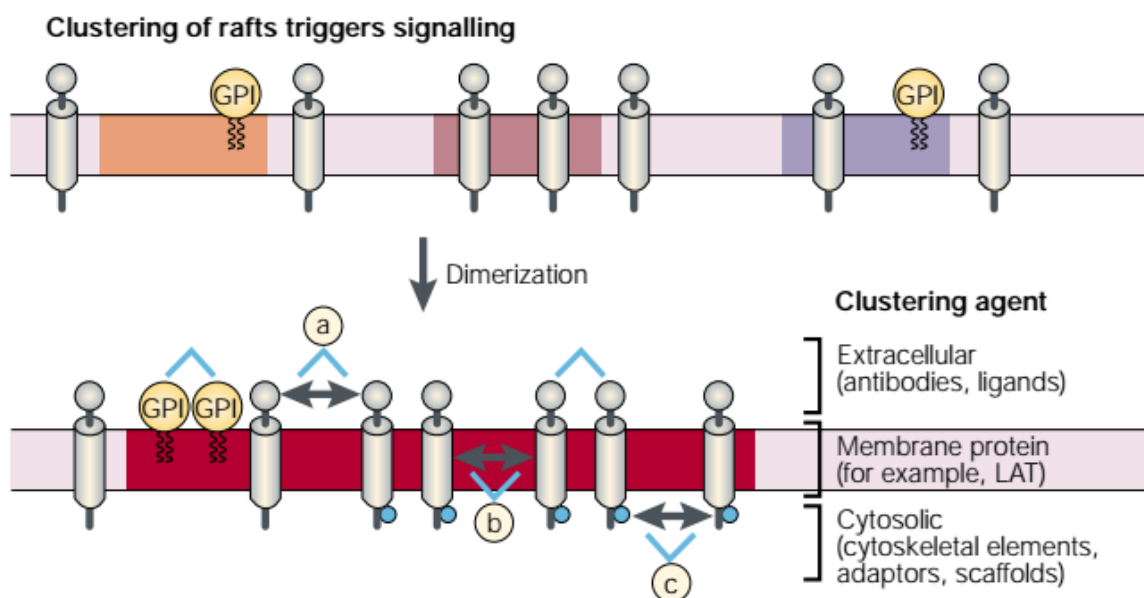


Figura 04: Este modelo propõe a existência de diversas balsas na membrana, que se diferem pela composição da proteína nelas presente (diferentes balsas demonstradas em laranja, lilás e roxas). A ativação da proteína com âncora de GPI promove o agrupamento das balsas (em vermelho) promovendo a dimerização de receptores e de enzimas. O agrupamento pode ocorrer tanto extracelularmente (a), dentro da membrana (b) ou no citosol (c). Os sinais extracelulares podem também aumentar a afinidade da proteína nas balsas que podem recrutar outras proteínas, interligando outras balsas. Fonte: Simons & Toomre (2000).

Moléculas envolvidas no reconhecimento de bactérias pelo sistema imune inato como o CD14 (proteínas com âncora de glicosilfosfatidilinositol) e hsp's (*heat shock proteins*) são encontradas como constituintes das balsas lipídicas. Em contraste, outras moléculas como TLR4, CXCR4 (*chemokine receptor 4*) e GDE5 (*growth differentiation factor 5*), que estão relacionadas à ativação celular não são encontradas como constituintes das balsas lipídicas, mas são imediatamente recrutadas após estímulo com LPS. A partir disso, o modelo proposto funcional de ativação do sistema imune inato ocorre da seguinte forma: LPS se ligam às moléculas de CD14, que residem normalmente nos microdomínios. Após a ligação, o receptor TLR4 é recrutado para o sítio de ligação do LPS dentro da balsa lipídica e

o complexo LPS/CD14, se associa ao complexo TLR4/MD-2 ativando a cascata de sinalização do TLR4 (TRANTAFILOU et al., 2002).

Estudos demonstraram que, tanto o LPS como o ácido láurico (12:0) induz a dimerização e recrutamento do receptor TLR4 para as balsas lipídicas levando a um posterior acionamento da sinalização intracelular. Provavelmente isso ocorre devido a presença do lipídeo A (estrutura constituinte do LPS) ser formado por ácidos graxos saturados, o que ajuda a iniciar a organização da balsa para a fase líquida ordenada (*L_o phase*), desencadeando os processos de ativação do TLR4 (WONG et al., 2009).

Os processos de dimerização e recrutamento do TLR4 para as balsas lipídicas são os passos iniciais requeridos que precedem a ativação da sinalização intracelular. Pesquisas demonstraram que células de camundongos da linhagem RAW264.7 tratadas com LPS induziu o recrutamento do receptor TLR4 para as balsas lipídicas e subsequentemente induziu a produção da citocina TNF α . Essas mesmas células, quando tratadas com metil- β -dextrina, um inibidor de balsas lipídicas, reduziu significativamente a produção de citocinas induzida pelo LPS sugerindo que as balsas lipídicas são essenciais para a transdução dos sinais e expressão de genes alvo mediado por TLR4 (TRANTAFILOU et al., 2002).

Estudos *in vitro* e em animais indicam que as balsas lipídicas também são modificadas pelos ácidos graxos da dieta. Provavelmente grandes quantidades de PUFA n3 provenientes da dieta possam ser incorporadas pelas balsas lipídicas, modulando a estrutura e composição das mesmas, uma vez que apresentam baixa afinidade ao colesterol promovendo o deslocamento das proteínas sinalizadoras presentes nas balsas (YAQOOB, 2009; SCHUMANN et al., 2011).

A partir do que foi exposto até o momento, acredita-se que a composição dos ácidos graxos presentes nas membranas plasmáticas e nas balsas lipídicas sejam influenciadas pelo padrão dietético, levando a uma mudança funcional da célula investigada. Os enterócitos são as células que possuem contato inicial com a disponibilidade dos ácidos graxos advindos da dieta e suas células são as primeiras a sofrerem alterações relativos a esse padrão. Uma dieta obesogênica apresenta uma grande oferta de ácidos graxos saturados, que podem preferencialmente ser incorporados na esfingomielina constituinte das balsas lipídicas, fazendo com que essas balsas fiquem mais propensas a um estado líquido ordenado (*L_o phase*), garantindo uma maior eficiência na ativação dos receptores TLR4, que estão

constantemente sendo estimulados pela grande presença de seus agonistas como os LPS e os próprios ácidos graxos saturados da dieta.

Se o TLR4 não for ativado primariamente nas balsas lipídicas, todo o processo de sinalização intracelular não ocorrerá e comprometendo a produção de citocinas inflamatórias derivadas da ativação dessa via, que iniciam o processo de inflamação na obesidade.

É sabido que a dieta hiperlipídica que induz a obesidade promove a produção constante de citocinas pró-inflamatórias levando a uma inflamação crônica duradoura. Nesse sentido, pretende-se investigar se os tratamentos com Coa, Gos e COAG, alimentados com uma dieta hiperlipídica apresentam uma alteração no perfil dos ácidos graxos dos fosfolípidos (PC e PE) presentes nas membranas e da esfingomielina (SM) presente nas balsas lipídicas do cólon, com a finalidade de observar se a mudança favorece uma composição de ácidos graxos mais insaturados ao invés dos saturados, o que levaria a uma melhora no quadro inflamatório a partir da diminuição da ativação dos receptores TLR4 nesse tecido.

A mudança no perfil lipídico dos enterócitos associados à mudança da microbiota intestinal a partir dos tratamentos administrados nos levaria a um melhor entendimento da ação desses compostos nas alterações fisiológicas observadas no intestino durante a obesidade.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivos gerais*

Verificar a ação dos produtos derivados do soro de leite, o Coa e o Gos isoladamente e também associados (COAG), como tratamentos na prevenção da obesidade. Para isso será observado se ocorrem mudanças na microbiota intestinal, no perfil de ácidos graxos dos fosfolipídios de membrana do cólon e diminuição na expressão de citocinas pró-inflamatórias *in vivo* em camundongos induzidos à obesidade por dieta hiperlipídica.

3.2. *Objetivos específicos*

- Avaliar se a administração de COAG modifica a massa corporal e o conteúdo de gordura nos animais tratados com dieta hiperlipídica;
- Dosar as citocinas pró e anti-inflamatórias tais como: fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon γ (IFN γ), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) no duodeno, ceco e cólon.
- Investigar a expressão proteica do Toll Like-4 (TLR4) no cólon;
- Determinar e comparar a composição da microbiota intestinal a partir das fezes de camundongo pela análise de metagenômica.
- Analisar o perfil dos ácidos graxos das classes de lipídios polares fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esfingomielina de membrana do cólon.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção do Coacervado de Proteínas do Soro de Leite (PSL) - Coacervação em Quitosana

O soro de leite empregado para a produção do coacervado de proteínas do soro de leite (Coa) é de procedência da Empresa Alibra-PR. A quitosana utilizada para coacervação foi de média massa molar com grau de desacetilação em torno de 75-85% e viscosidade de 200-800 cPs (Sigma-Aldrich 44.887-7). 0,75% desse biopolímero foi solubilizado juntamente com ácido cítrico P.A (0,4% p/v). Após esta etapa, a solução de quitosana foi adicionada ao soro de leite ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) numa proporção de 1:1 a pH de 6,0 para obtenção do coacervado de PSL. Após a separação de fases que remete a coacervação, o líquido foi resuspendido e centrifugado, o sobrenadante descartado e coletado o pellet que foi posteriormente liofilizado (Anexo 01).

Após liofilização, foi realizada a quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford, para realização do cálculo de Coa a ser administrado nos animais. O valor de proteínas diárias administrada foi de 100mg/proteína/dia o que remete a um valor de 650mg/kg/dia de Coa, valor este corrigido para o peso individual de cada animal. Na tabela 01 encontra-se a descrição e quantidade dos macro e micronutrientes contidos no coacervado.

Tabela 01: Composição nutricional do Coacervado de proteínas do soro de leite:

Macro e micronutrientes	g/100g
Proteínas	30
Lactose	1,7
Lipídeos	0,4
Ca	0,47
K	0,37
Mg	0,06
P	0,46
Na	0,81

Além disso, também foi verificado se o produto final liofilizado da coacervação de PSL apresentava os peptídeos bioativos de interesse como a α -lactalbumina, β -lactoglobulina (β -Lg), albumina de soro bovino (BSA) e lactoferrina. Para isso foi

realizada a análise de SDS-Page e foram identificadas através de seu peso molecular (Lactoferrina - 86KDa; BSA -66KDa; β -Lg dímero - 34KDa; β -Lg monômero - 18KDa; α -lactalbumina - 14KDa).

4.2. Galactooligossacarídeo (Gos)

O Gos utilizado no ensaio experimental foi de origem comercial, na forma de pó, da Empresa *Kenkou Ichiba*, proveniente do Japão, composto por 55% de galactooligossacarídeo e 45% de outros carboidratos como a lactose, galactose e glicose. O Gos foi ressuspendido em água e a dose administrada foi de 5000mg/Kg/dia, valor este corrigido para o peso de cada animal.

4.3. Animais e dieta

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 com 3 semanas (20g de peso inicial), divididos em cinco grupos experimentais com número de 07 animais em cada grupo, que receberam tratamento durante 16 semanas. Os animais foram obtidos e mantidos no biotério da Universidade de Mogi das Cruzes durante todo o período de ensaio experimental, à temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade do ar $60 \pm 5\%$, com acesso *ad libitum* à dieta e água. Os grupos experimentais foram divididos em relação ao tipo de dieta (Normolipídica e Hiperlipídica) e tratamentos somente para os grupos que receberam dieta hiperlipídica com Gos, Coa e COAG.

Para os grupos de dieta normolipídica e normocalórica, foi oferecida a ração “AIN - 93M” (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993), com conteúdo calórico de 3.802,8 Kcal/kg dos quais 75,8% é fornecida por carboidratos, 14,7% por proteínas e 9,5% de lipídeos (óleo de soja). A dieta hiperlipídica e hipercalórica foi adaptada a partir da AIN – 93M com conteúdo calórico de 5100 Kcal/kg dos quais 38,8% são fornecidos por lipídeos (banha de porco e óleo de soja), 47,1% por carboidratos e 14,1% de proteínas (tabela 02).

O perfil dos ácidos graxos presentes nas dietas normo e hiperlipídicas foram também quantificadas em porcentagem pela técnica de cromatografia gasosa e estão descritas na tabela 03.

Tabela 02: Constituintes utilizados nas dietas Normolipídica e Hiperlipídica:

Componentes (g)	Normolipídica	Hiperlipídica
Amido de Milho	720,7	450
Sacarose		150
Caseína	140	180
Óleo de Soja	40	40
Banha de porco	-	180
Celulose	50	
Mix vitamínico	10	10
Mix Mineral	35	35
L-Cistina	1,8	1,8
Bitartarato de Colina	2,5	2,5
Butil hidroquinona, g/kg	0,008	0,008
Total (g)	1000	1000
Energia, kcal/kg	3802,8	5362,8

Tabela 03: Perfil dos ácidos graxos nas dietas Normolipídica e Hiperlipídica:

Ácidos graxos (%)	Normolipídica (%)	Hiperlipídica (%)
C14:0	0,085	1,315
C14:1		0,029
C15:0	0,038	0,023
C15:0	0,046	0,093
C15:1c		0,016
C16:0	13,374	21,832
C16:1n7	0,196	2,041
C17:0	0,103	0,466
C16:3n4	0,056	0,299
C18:0	2,97	10,071
C18:1n9	23,859	37,678
C18:1n7	1,15	0,023
C18:2n6c	52,586	21,824
C18:2n9	0,116	0,03
C18:3n6		0,073
C18:3n4	0,107	0,027
C18:3n3	4,059	1,658
C20:0iso		0,091
C18:4n3		0,017
C20:0	0,421	0,202
C20:1n9	0,428	0,678
C20:2n6	0,044	0,681
C20:3n6	0,024	0,101
C21:0		0,258
C20:4n6		0,128
C20:4n3		0,019
C22:0	0,052	0,037
C22:2n6		0,042
C21:5n3	0,063	0,026
C22:4n6		0,114
C22:5n3	0,199	0,075
C24:0		0,018
C22:6n3		0,019
TOTAL	100,00	100,00
Σ Saturados	17,12	34,33
Σ MUFA	25,63	40,47
Σ PUFA	57,25	25,13
Σ PUFA n3	4,32	1,81
Σ PUFA n6	52,65	22,96
Σ n3/n6	0,08	0,08

A seguir, fluxograma da distribuição dos grupos experimentais em relação às dietas e tratamentos:

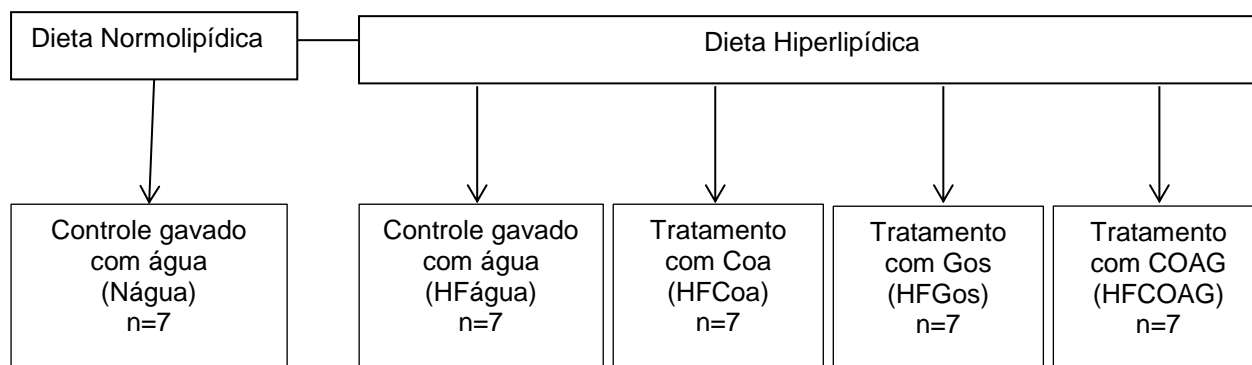


Figura 05: Divisão dos grupos em dietas e tratamentos.

- O grupo controle (Nágua) recebeu uma dieta normocalórica e água administrado por gavagem, no volume de 300ul;
- O grupo controle (HFágua) recebeu dieta hiperlipídica e água administrado por gavagem, no volume de 300ul.
- O grupo HFCoa recebeu a mesma dieta hiperlipídica e com COA administrado por gavagem na dosagem de 650mg de coacervado de PSQ/Kg/dia, ressuspensa em 300μL de água.
- O grupo HFGos recebeu a mesma dieta hiperlipídica e GOS, que foi administrado por gavagem na dosagem de 5000mg/Kg/dia,, ressuspensa em 300μL de água.
- O grupo HFCOAG recebeu a mesma dieta hiperlipídica e COA + GOS, que foi administrado por gavagem nas mesmas concentrações individuais de cada um acima citado, em dose única, ressuspensa em 300μL de água.

A ingestão alimentar e o peso dos animais foram monitorados durante todo o experimento e registrados semanalmente. A fim de minimizar a influência aguda do

status prandial nos resultados experimentais, todos os animais foram submetidos a jejum durante a noite anterior à manhã da eutanásia.

O método da eutanásia utilizado foi por anestesia geral seguido de punção cardíaca, com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Mogi das Cruzes, sob Protocolo 004/2015 (Anexo2).

Os animais foram primeiramente anestesiados utilizando-se a combinação de ketamina e xilasina na concentração de 66,6 mg/kg de ketamina e 13,3 mg/kg de xilasina, por via intraperitoneal. O plano anestésico é necessário para coleta de sangue via punção cardíaca para suprimir completamente a percepção dos estímulos dolorosos.

Após a anestesia, o animal foi colocado em uma superfície plana, em decúbito lateral direito e uma agulha foi inserida em um ângulo de 10 a 30° acima do abdômem, lateralmente ao processo xifóide. A retirada do sangue foi com agulha 26G acoplada à seringa de 1,0ml. Esse procedimento resultou na eutanásia do animal.

O sangue total coletado foi armazenado em tubos plásticos para a extração do soro, que se deu após a centrifugação (500 x g) durante 15 minutos, à temperatura de 12 °C. Após o final da centrifugação o soro foi aliquotado em tubos do tipo *eppendorf* (1,5 mL) e armazenado em *freezer* -80°C, para dosagens posteriores. Foram coletados os seguintes tecidos do intestino: duodeno, ceco e cólon (porção proximal), que foram lavados em solução salina e armazenados a -80°C. O fígado, músculo gastrocnêmio, sóleo e os tecidos adiposos viscerais epididimal, mesentérico e retroperitoneal também foram coletados e seus dados ponderais foram registrados para realização do cálculo da massa relativa desses tecidos.

4.4. Determinação do perfil de ácidos graxos do cólon

Os lipídeos foram extraídos do tecido com uma solução de clorofórmio: metanol: água (2:1:0,5) segundo o método de FOLCH *et al.*, (1957) (Anexo 03). Os extratos lipídicos foram submetidos a uma atmosfera de nitrogênio para evaporação do solvente sem oxidação dos ácidos graxos e realizado a separação das classes de lipídeos por cromatografia de camada delgada. Para a separação de classes dos lipídeos polares foram utilizadas placas de 20 X 20 cm, impregnadas com sílica, que

foram aquecidas em estufa a 100°C. O extrato lipídico extraído foi ressuspenso em 200 µL de heptano e aplicado à base das placas para a separação das diferentes classes de fosfolípidos: Fosfatidilcolina (PC), Fosfatidiletanolamina (PE) e Esfingomielina (SM) utilizando padrões da marca Sigma®. Com referência as polaridades das classes e tempo de corrida, foi utilizada a seguinte mistura de solventes: clorofórmio, metanol e água na proporção de 65:35:4 (por volume) (CHRISTIE, 1989) (Anexo 04). As bandas das diferentes classes foram reveladas com diclorofluoresceína e identificadas sob luz ultravioleta (UV), as mesmas foram raspadas, eluídas com metanol e metiladas para posterior análise em cromatografia gasosa. As frações foram metiladas utilizando cloreto de acetila e metanol como catalisadores da reação.

Os metil ésteres foram analisados por cromatografia gasosa (GC), acoplada a um ionizador de chama (FID) (VARIAN GC 3900) e o perfil de ácidos graxos foi determinado com o cálculo de tempo de retenção, utilizando-se um padrão de ácidos graxos com tempo de retenção conhecido (Supelco, 37 Componentes).

4.5. Determinação de citocinas do tecido intestinal por ELISA

Para a determinação das citocinas inflamatórias, os tecidos (duodeno, ceco e cólon) foram colocados em 1,0 mL de tampão específico para extratos totais, com a seguinte composição: Trizma base 100 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, SDS 10%, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM. As proteínas totais foram dosadas pelo método de Bradford e as citocinas IL-6, IL-10, IL-1 β , IFN γ e TNF α utilizando kits comerciais R&D Systems®, pelo método enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) de captura.

4.6. Protocolo de Western blotting para proteína TLR4 do cólon

O tecido intestinal foi adicionado em 800 µL de tampão específico, preparado no dia do experimento, para extratos totais de proteínas, tendo a seguinte composição: Trizma base 100 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, SDS 10%, fluoreto de sódio 100 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 40 minutos a 12000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi mantido em gelo e o teor de proteínas totais determinados pelo

método de Bradford. As amostras foram adicionadas, na proporção de 4:1, do tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,01%, fosfato de sódio 50mM, glicerol 25%, SDS 1%) contendo 200mM de DTT. O volume de 100 µg de proteína foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante a 10%. Após separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, à temperatura ambiente, e a membrana foi bloqueada por 2 horas em solução bloqueadora, composta de solução basal (Trizma base 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 50 µl/ml) contendo 1% de albumina bovina. Em seguida, foi feita a incubação com o anticorpo primário específico por 2 horas à temperatura ambiente, em solução basal com BSA 1%. A seguir, a membrana foi incubada por uma hora com anticorpo secundário associado à peroxidase. O anticorpo secundário constituirá sempre de uma anti-imunoglobulina dirigida contra o animal produtor de anticorpo primário. Após algumas lavagens com solução basal, a membrana foi revelada por quimioluminescência após adição do reagente de revelação (ECL da *Amersham - UK*) e então a membrana foi lida em equipamento fotodocumentador e a imagem captada por um programa específico. As bandas de interesse foram identificadas pelo seu padrão de migração eletroforética, por comparação com padrões de Mr conhecidos e quantificada por densitometria, utilizando-se o programa *ScionImage*.

4.7. Extração de DNA metagenômico de amostras fecais de camundongo

Para identificação dos principais grupos de bactérias presentes no intestino, foram realizadas coletas das fezes dos animais no final do experimento, uma semana antes da eutanásia. As fezes foram coletadas frescas, utilizando luvas e pinças esterilizadas. Elas imediatamente foram armazenadas em eppendorfs estéreis e congeladas em -80/C até a data do processamento. O DNA metagenômico das amostras fecais foi extraído utilizando o kit de extração de DNA de microbiota fecal – *Wizard Genomic DNA Purification kit* (Promega, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O produto de extração foi quantificado pelo Nanodrop, amplificado pela técnica de PCR e a qualidade da amplificação feita por gel de agarose 1% (p/v) corado com Gel Red e fotografado.

4.8. Construção da biblioteca de amplicons do gene 16S rRNA de Bacteria

Para a construção da biblioteca de amplicons, foram utilizados primers das sequências 515f-926r das regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA, seguindo sempre a orientação 5' – 3'. A construção dos primers foi desenhada por Caporaso *et. al.*, (2012) e a construção dos *barcodes* redesenhado por Walters *et. al.* (2016). Cada primer forward é constituído de um adaptador 5' Illumina, um *barcode*, um forward primer *pad*, um forward primer *linker* e a sequência do primer 515f, como segue abaixo:

AATGATACGGCGACCA	CGGAGATCTACACGCT	XXXXXXXXXXXX	TATGGTAATT	GT	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA
Adaptador 5' Illumina		Barcode	Primer pad	Linker	Sequência do primer

As sequências dos *barcodes* em cada primer forward utilizado estão listadas no anexo 05. O primer reverse não contém *barcode* e contém um adaptador 3' Illumina reverse, um reverse primer *pad*, um reverse primer *linker* e a sequência do primer 926r, como segue abaixo:

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT	AGTCAGCCAG	CC	GGACTACNVGGGTWTCTAAT
Adaptador 3' Illumina	Primer pad	Linker	Sequência do primer

Foi realizada a amplificação utilizando técnica de PCR das amostras de DNA das fezes extraído anteriormente em um volume total de 50ul de reação. Foi adicionado um primer 515f diferente em cada amostra, por conterem *barcodes* diferentes e que serão reconhecidos posteriormente no tratamento dos dados gerado pelo sequenciamento, já que esses primers constituem a biblioteca de identificação das amostras. A enzima polimerase utilizada na reação de PCR foi a *KAPA HiFi HotStart ReadyMix PRC kit* (KapaBiosystems®), que é a indicada pela Empresa Illumina para sequenciamento utilizando a plataforma Miseq. O primer 926r foi o mesmo para todas as amostras.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems) segundo as condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 32 ciclos de 94°C por 45 segundos, 56°C por 60 segundos e 72°C por 90 segundos; extensão final de 10 minutos a 72°C.

Após a amplificação, foi realizado uma eletroforese de gel de agarose para verificar a presença das bandas amplificadas. O tamanho do fragmento amplificado foi em torno de 500pb. Após a detecção das bandas por eletroforese, o produto de

PCR foi submetido a uma purificação utilizando *beads* magnéticas para retirada dos primers e de outros produtos residuais. Essa purificação consiste na inserção de uma solução contendo *beads* magnéticas que interagem com o fragmento de DNA da amostra, e os tubos contendo a solução é então colocada em uma rack magnética que atrai as *beads* arrastando assim o DNA. Posteriormente é realizada etapas de lavagem utilizando etanol 80% e uma solução de Tris 10mM para retirada do DNA das *beads*. O protocolo detalhado dessa reação se encontra no anexo 06.

Após a purificação, os fragmentos de DNA foram quantificados utilizando Qubit por fluorescência para aquisição da massa e submetidas ao Bioanalyser para aquisição do tamanho total do fragmento, para o cálculo da concentração do DNA em nM.

O sequenciamento do DNA metagenômico foi processado no Centro de Pesquisa René Rachou (Fiocruz – BH), utilizando o equipamento de sequenciamento de nova geração (NGS) da Illumina Myseq. Após o sequenciamento, os dados brutos obtidos no sequenciador foram convertidos em sequências no formato fasta para que possam ser manipulados na bioinformática.

4.9. Bioinformática

Como primeira etapa, foi realizado um pré-processamento utilizando o software Trimmomatic v0.32 (BOLGER et al., 2014). O filtro de qualidade foi aplicado percorrendo uma janela de 4 bases ao longo das sequências a partir da extremidade 5'. Foram eliminadas sequências com pontuação média da janela inferior à escala Phred 20 e com tamanho menor que 50. Com o uso do programa PEAR v0.9.6 (ZHANG et al., 2014), os pares de sequências (complementares à sequência de DNA anti-sense e sense) de cada read foram unidos a partir de suas regiões de sobreposição.

Para o processamento e análise das sequências foi utilizado o QIIME (CAPORASO et al., 2010), Quantitative Insights Into Microbial Ecology. As sequências filtradas foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com uma identidade mínima de 97% utilizando o algoritmo UCLUST (EDGAR, 2010) e o banco de dados para comparação Greengenes 13.8 (DESANTIS et al., 2006). Quimeras foram removidos utilizando o *ChimeraSlayer* (HAAS et al., 2011).

Como análises de diversidade dos dados metagenômicos realizadas no QIIME, foi feita a construção de árvores filogenéticas com o FastTree (PRICE et al., 2010), a identificação de grupos taxonômicos com o RDP_Classifier v2.2 (WANG et al., 2007) e cálculos de diversidade beta com o Unifrac (LOZUPONE et al., 2005) e diversidade alfa.

Para realização das análises estatísticas, empregou-se o teste não paramétrico PERMANOVA (ANDERSON et al., 2013) utilizando sua versão implementada no pacote vegan (OKSANEN et al., 2007) do software estatístico R (R Core Team, 2000) para identificar se há diferença significativa entre as dietas. Para esta análise os dados foram agrupados de acordo com as dietas hiperlipídica e normocalórica.

A determinação do grau de similaridade entre amostras de diferentes tratamentos e dietas foi determinada em uma escala quantitativa, utilizando um método de agrupamento hierárquico completo implementado no R (R Core Team, 2000) em conjunto com um método euclidiano para o cálculo da distância entre as amostras.

4.10. Análise Estatística

A análise dos dados biométricos e fisiológicos foi realizada através do software *SigmaStat* (versão 3.1, SigmaStat, SYSTAT, Point Richmond, CA). A média aritmética e o erro padrão da média (EPM) calculados para todas as variáveis estudadas. Foi utilizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para verificar se os resultados apresentam distribuição normal. Após o período experimental os valores obtidos foram analisados pelo teste de variância de uma via (one-way ANOVA) para os dados paramétricos e pelo teste de *Kruskal-Wallis* para os dados não paramétricos. O nível de significância utilizado em todas as análises será inferior a 5%, ou seja, $p < 0,05$. Foi utilizado o teste de correlação de Pearson para identificar somente associações entre as variáveis fisiológicas e o teste de correlação de Spearman para associações entre a microbiota e as variáveis fisiológicas. As associações foram detectadas com intervalo de confiança de 90% (p) e com registro do coeficiente de determinação (R).

5. RESULTADOS

5.1. Biometria e Dietas

Ao final das 16 semanas de ensaio experimental, o grupo controle da dieta normolipídica (Nágua) obteve um maior consumo significativo da dieta em relação aos demais grupos submetidos à dieta hiperlipídica ($p < 0,001$). Embora o grupo Nágua tenha consumido uma quantidade maior de ração em gramas, quando realizado a conversão em Kcal, observa-se um consumo semelhante com os demais grupos, uma vez que a densidade energética da dieta hiperlipídica é maior (tabela 04). Analisando os grupos hiperlipídicos, observa-se que o tratamento HFGos apresentou um maior consumo em Kcal, que foi diferente do grupo HFCoa ($p = 0,0425$). Esse maior consumo observado no grupo HFGos refletiu em um maior ganho de massa corpórea ($p = 0,010$), que juntamente com o grupo HFÁgua ($p < 0,05$), diferiu significativamente do grupo Nágua. A figura 06 demonstra que esse aumento de massa corpórea nos grupos HFÁgua e HFGos ocorreu nas duas últimas semanas de experimento ($p < 0,01$).

Tabela 04: Massa corpórea e consumo alimentar em camundongos alimentados com dieta normolipídica e hiperlipídica e seus respectivos tratamentos.

Grupos	Nágua	HFÁgua	HFCoa	HFGos	HFCOAG
Consumo total (g)	2233,88 ± 4,8 ^a	1645,12 ± 6,3 ^b	1482,02 ± 4,6 ^b	1656,05 ± 3,8 ^b	1589,58 ± 3,8 ^b
Consumo total (Kcal)	8495,0 ± 18,3 ^{ab}	8822,45 ± 34,1 ^{ab}	7947,79 ± 24,9 ^a	9020,40 ± 20,6 ^b	8680,25 ± 20,3 ^{ab}
Massa corpórea inicial (g)	22,26 ± 0,42	21,64 ± 1,02	21,28 ± 0,47	20,98 ± 0,29	21,89 ± 0,64
Massa corpórea final (g)	29,82 ± 0,99	34,57 ± 2,01	31,89 ± 1,01	34,00 ± 2,02	31,49 ± 1,09
Ganho de massa corpórea (g)	7,56 ± 0,95 ^a	12,94 ± 1,10 ^b	10,61 ± 0,72 ^{ab}	13,02 ± 1,77 ^b	9,60 ± 1,17 ^{ab}
Eficiência energética (g/Kcal)	3,561 ± 0,45 ^a	5,866 ± 0,50 ^b	5,466 ± 0,37 ^{bc}	4,932 ± 0,76 ^{bc}	4,518 ± 0,55 ^{ac}

^{abc} Letras diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos. One-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni. MÉDIA ± ERRO PADRÃO (EPM).

A eficiência energética apresentou-se menor no grupo Nágua, que foi significativo em relação ao HFágua, HFCoa e HFGos ($p=0,0286$; $p=0,0121$ e $p=0,0242$ respectivamente), porém não foi diferente do grupo HFCOAG. Entre os grupos que receberam dieta hiperlipídica, somente o HFCOAG foi menor significativamente do seu controle HFágua ($p=0,0485$).

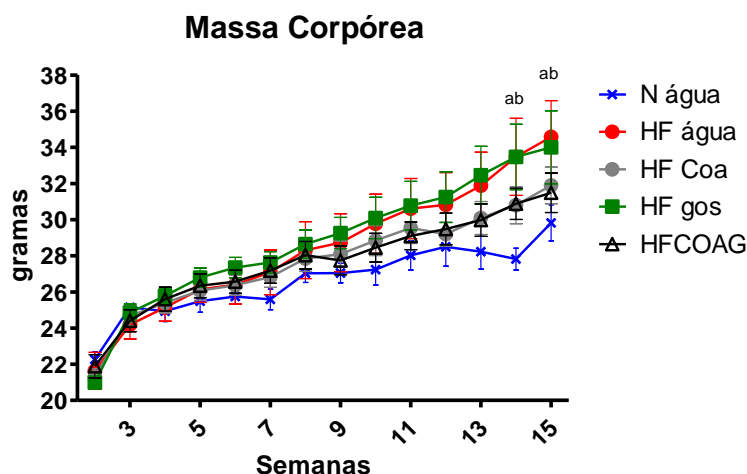


Figura 06: Evolução de massa corpórea dos animais alimentados com dieta normolipídica controle (Nágua) e hiperlipídica controle (HFágua) e tratamentos (HFCoa; HFGos e HFCOAG) durante as 16 semanas de ensaio experimental. (a) Nágua vs HFágua; (b) Nágua vs HFGos. Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni.

A figura 07 (A, B, C e D) expressa os valores médios relativos de peso dos tecidos adiposos brancos viscerais tais como, epididimal (TAE), mesentérico (TAM), retroperitoneal (TAR) e a soma desses três (Σ TAB), nos diferentes grupos experimentais. Nos valores médios de peso TAE, o grupo Nágua diferiu dos grupos HF tratados e controle ($p<0,05$), e quando se comprara o efeito dos tratamentos, podemos observar, mais uma vez que o grupo HFCOAG foi significativamente diferente do grupo controle HFágua ($p<0,05$) (figura 07 - A).

Na figura (07 - B) é possível observar o peso relativo do TAM, que apresentou os menores valores relativos no grupo Nágua, diferindo somente do HFágua ($p<0,05$). Já no tecido adiposo retroperitoneal (TAR) (figura 07 – C), observa-se que o grupo Nágua foi significativamente menor quando comparado aos grupos HF com ou sem tratamento ($p<0,05$).

Ao realizar a soma da massa relativa dos tecidos adiposos viscerais epididimal, mesentérico e retroperitoneal (Σ TAB), o grupo Nágua diferiu dos grupos HF tratados e não tratado, o que expede maior acúmulo de gordura visceral nesses

últimos. Contudo, somente o grupo HFCOAG demonstrou ser menor significativamente do grupo HFágua ($p < 0,05$) (figura 7-D).

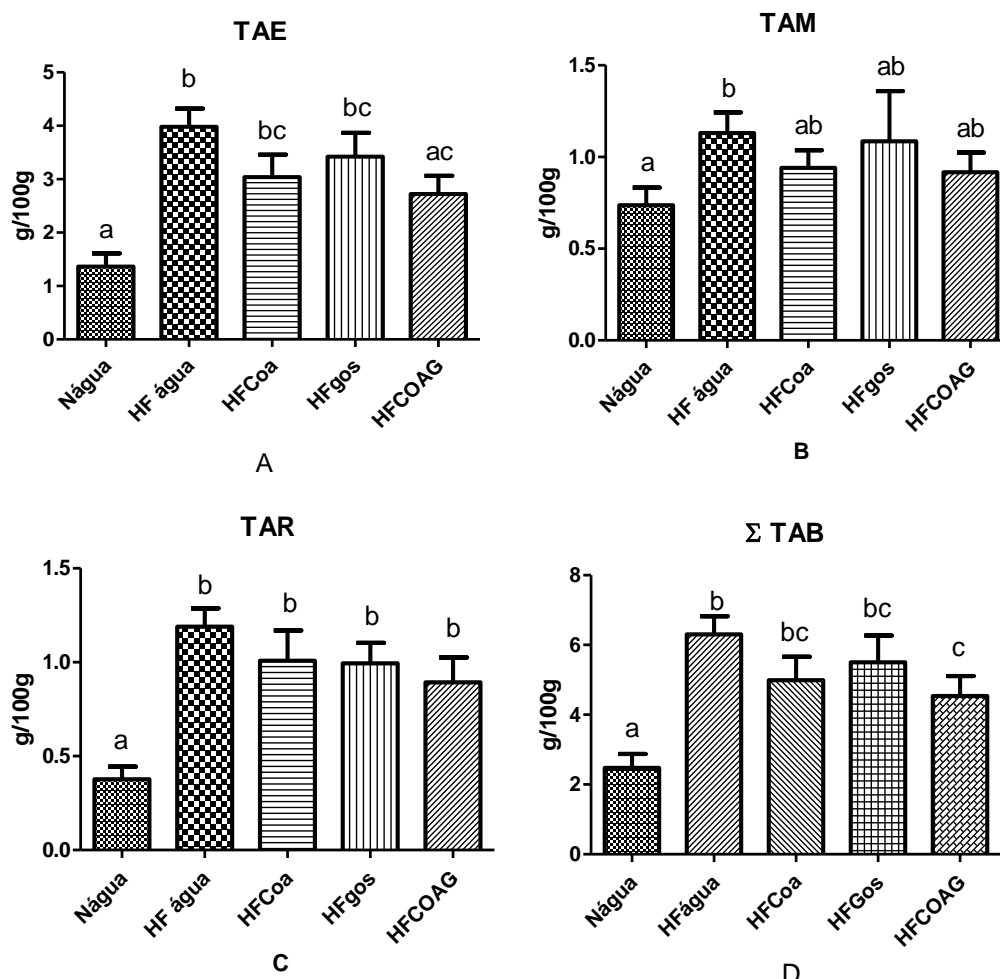


Figura 07 - Média da massa relativa dos tecidos adiposos epididimal – TAE; mesentérico – TAM; retroperitoneal – TER, expresso em g/100g de massa corporal, em animais alimentados com dieta normolipídica e hiperlipídica durante as 16 semanas de tratamento. Teste de Kruskal-Wallis; ^{abc} Letras diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre todos os tratamentos, com Média \pm Erro Padrão (EPM).

Foram observadas diferenças nas porções intestinais ($p > 0,05$) entre os grupos Nágua, HFCOA, HFGOS e HFCOAG para peso relativo do duodeno quando relacionado ao HFágua. Para ceco intestinal, o controle hiperlipídico (HFágua) e Nágua apresentaram menor massa relativa em relação aos grupos HFCOAG e HFGOS e quando se analisa o efeito do tratamento, o grupo HFCOA apresentou-se menor em relação aos HFGOS e HFCOAG ($p > 0,05$) (figura 08 - A e B). Em relação ao peso relativo do colón, foi possível observar uma diminuição significativa no grupo HFágua quando comparado ao grupo controle Nágua ($p > 0,05$). No fígado, não

foi visualizado aumento significativo do peso relativo entre nenhum grupo experimental (figura 08 - C e D).

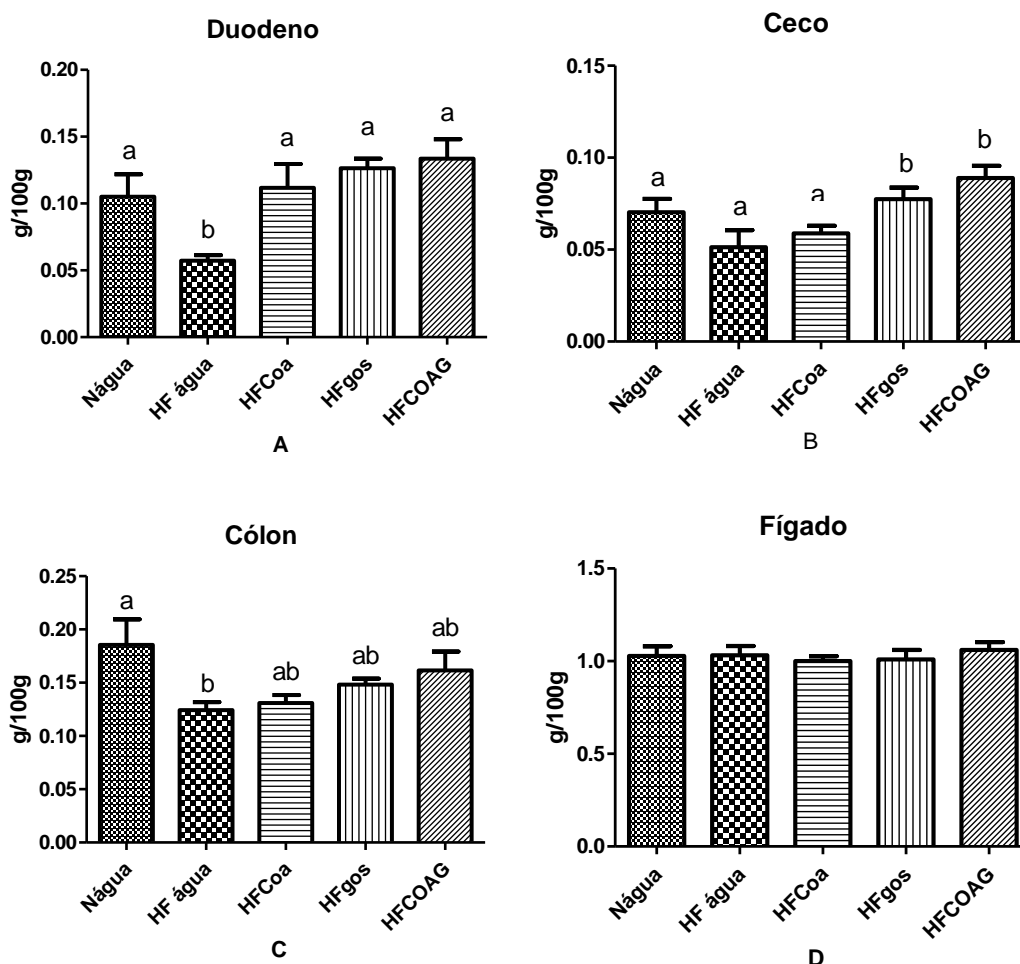


Figura 08 - Média da massa relativa dos tecidos intestinais duodeno, ceco, cólon e no fígado, expresso em g/100g de massa corporal, em animais alimentados com dieta normolipídica e hiperlipídica durante as 16 semanas de tratamento. Teste de Kruskal-Wallis. Média \pm Erro Padrão (EPM); ^{abc} Letras distintas indica diferença significativa com valor de ($p < 0,05$).

5.2. Perfil de Ácidos Graxos

Pela análise de cromatografia de coluna delgada, seguido da cromatografia gasosa, foi possível identificar o perfil dos ácidos graxos constituintes das principais frações de lipídeos estruturais do cólon: esfingomielina (SM), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilcolina (PC). A análise do perfil de ácidos graxos permitiu avaliar a porcentagem dos principais grupamentos, como os ácidos graxos saturados,

monoinsaturados (Mono), polinsaturados (PUFA) e, como subdivisão dessa classe, os PUFAs da série ômega 3 (n3) e ômega 6 (n6). Os principais ácidos graxos que compõe cada fração lipídica nos diferentes grupos experimentais, assim como a estimativa da atividade da enzima dessaturase $\Delta 9$, índice lipogênico e razão n3/n6 estão apresentadas nas tabelas 05 a 07.

Tabela 05: Porcentagem dos principais ácidos graxos, atividade da dessaturase $\Delta 9$, índice lipogênico e razão n3/n6 da esfingomiellina (SM) do cólon de camundongos tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica:

Esfingomiellina (SM)	Nágua	Hfágua	HFCOA	HFGos	HFCOAG
Ácido mirístico (14:0)	6,10 ± 1,55	4,56 ± 1,41	3,55 ± 0,63	5,16 ± 1,29	4,60 ± 0,93
Ácido miristoleico (14:1n9)	1,29 ± 0,35 ^a	1,03 ± 0,52 ^a	1,41 ± 0,49 ^{ab}	1,04 ± 0,30 ^{ab}	1,88 ± 0,65 ^b
Ácido pentadecanoico (15:0)	4,68 ± 2,09	5,38 ± 0,164	4,55 ± 1,57	5,52 ± 0,96	5,34 ± 0,81
Ácido palmítico (16:0)	12,66 ± 2,17	10,96 ± 1,67	12,98 ± 2,95	12,82 ± 2,63	10,43 ± 1,33
Ácido palmitoleico (16:1n7)	2,69 ± 0,82	2,62 ± 0,51	2,83 ± 0,47	3,02 ± 1,01	3,28 ± 0,98
Ácido esteárico (18:0)	9,44 ± 2,84	5,84 ± 1,40	10,43 ± 3,96	8,91 ± 1,93	5,53 ± 0,64
Ácido vacênico (18:1n7)	1,38 ± 0,45 ^{ab}	0,48 ± 0,14 ^a	1,81 ± 0,47 ^b	2,03 ± 0,71 ^b	1,41 ± 0,61 ^b
Ácido oleico (18:1n9)	10,9 ± 1,48	12,22 ± 4,71	9,31 ± 2,77	10,85 ± 2,63	9,21 ± 1,68
Ácido linoleico (18:2n6)	7,47 ± 4,07	7,34 ± 3,29	5,51 ± 2,54	6,36 ± 2,28	5,48 ± 1,51
Ácido γ -linolênico (18:3n6)	----	----	1,01 ± 0,16	1,12 ± 0,43	1,33 ± 0,45
Ácido α -linolênico (18:3n3)	----	----	----	----	----
Ácido araquídico (20:0)	4,16 ± 1,07 ^{ab}	2,94 ± 0,97 ^{ab}	1,67 ± 0,84 ^a	2,97 ± 1,05 ^{ab}	4,60 ± 0,78 ^b
Ácido di-homo- γ -linoleico (20:3n6)	----	----	----	----	----
Ácido araquidônico (20:4n6)	----	----	1,05 ± 0,18	1,65 ± 0,58	1,25 ± 0,36
EPA (20:5n3)	9,57 ± 0,19	1,72 ± 0,78	3,26 ± 1,13	3,04 ± 1,67	2,46 ± 0,43
DHA (22:6n3)	3,62 ± 0,59	1,50 ± 0,14	0,45 ± 0,71	2,25 ± 1,46	1,46 ± 0,69
Atividade $\Delta 9$ (16:1n7/16:0)	0,244 ± 0,12	0,254 ± 0,13	0,241 ± 0,18	0,229 ± 0,23	0,31 ± 0,31
Atividade $\Delta 9$ (18:1n9/18:0)	1,325 ± 0,66	2,384 ± 1,19	1,44 ± 2,84	1,25 ± 1,25	1,68 ± 1,68
Índice lipogênico (16:0/18:2n6)	2,71 ± 1,35	2,11 ± 1,06	2,63 ± 1,18	3,60 ± 1,47	2,42 ± 0,99
n3/n6	1,38 ± 0,65	0,73 ± 0,20	0,77 ± 0,20	1,04 ± 0,25	1,20 ± 0,42

Teste de Kruskal-Wallis. Média ± Erro Padrão (EPM); ^{ab} Letras distintas indica diferença significativa com valor de (p<0,05).

A tabela 05 mostra que houve mudanças na composição dos ácidos graxos da fração SM, principalmente pelo grupo HFCOAG, que apresentou as maiores porcentagens ácido miristoleico (14:1n9), diferindo do Nágua e HFágua (P<0,05). O ácido araquídico (20:0) também foi maior no grupo HFCOAG diferindo somente do grupo HFCoa (p<0,05). Já o ácido vacênico (18:1n7) apresentou um incremento significativo em todos os tratamentos hiperlipídicos (HFCoa, HFGos e HFCOAG) diferindo significativamente do seu controle hiperlipídico (HFágua) (p<0,05).

Tabela 06: Porcentagem dos principais ácidos graxos, atividade da dessaturase $\Delta 9$, índice lipogênico e razão n3/n6 da fosfatidiletanolamina (PE) do cólon de camundongos tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica:

Fosfatidiletanolamina(PE)	Nágua	HFágua	HFCOA	HFGos	HFCOAG
Ácido mirístico (14:0)	7,28 ± 4,05	6,74 ± 2,23	7,34 ± 3,81	3,58 ± 0,94	4,61 ± 0,55
Ácido miristoleico (14:1n9)	1,59 ± 0,44 ^{ab}	1,25 ± 0,66 ^{ab}	2,16 ± 0,59 ^b	1,18 ± 0,82 ^a	1,94 ± 0,51 ^b
Ácido pentadecanoico (15:0)	6,74 ± 1,05	5,60 ± 1,35	5,75 ± 1,31	5,79 ± 2,15	7,38 ± 0,53
Ácido palmítico (16:0)	9,97 ± 4,99	7,95 ± 3,98	10,07 ± 5,81	10,69 ± 4,78	10,66 ± 4,03
Ácido palmitoleico (16:1n7)	6,40 ± 2,16 ^a	2,74 ± 1,37 ^b	3,86 ± 2,23 ^{ab}	2,96 ± 1,32 ^{ab}	3,39 ± 1,28 ^{ab}
Ácido esteárico (18:0)	5,61 ± 2,81	4,94 ± 2,47	5,56 ± 3,21	7,48 ± 3,34	5,92 ± 2,24
Ácido vacênico (18:1n7)	0,57 ± 0,21 ^b	0,73 ± 0,16 ^b	1,32 ± 0,11 ^{ab}	1,84 ± 0,08 ^a	1,22 ± 0,23 ^b
Ácido oleico (18:1n9)	6,72 ± 3,36	8,87 ± 4,44	10,94 ± 6,32	9,12 ± 4,08	8,91 ± 3,37
Ácido linoleico (18:2n6)	4,03 ± 0,90 ^a	4,55 ± 1,18 ^{ab}	3,88 ± 1,23 ^a	5,03 ± 0,99 ^b	6,40 ± 0,55 ^b
Ácido γ -linolênico (18:3n6)	1,18 ± 0,59	----	0,73 ± 0,42	0,44 ± 0,20	0,62 ± 0,24
Ácido α -linolênico (18:3n3)	----	----	----	----	----
Ácido araquídico (20:0)	3,62 ± 1,12	2,29 ± 0,45	3,76 ± 0,66	2,90 ± 0,90	3,06 ± 0,67
Ácido di-homo- γ -linoleico (20:3n6)	0,92 ± 0,46	----	----	----	----
Ácido araquidônico (20:4n6)	----	----	1,21 ± 0,70	4,01 ± 1,79	----
EPA (20:5n3)	4,96 ± 2,48	5,55 ± 2,78	2,26 ± 1,30	2,77 ± 1,24	2,34 ± 0,89
DHA (22:6n3)	1,19 ± 0,60	1,55 ± 0,77	1,42 ± 0,82	1,81 ± 0,81	0,70 ± 0,26
Atividade $\Delta 9$ (16:1n7/16:0)	0,39 ± 0,20	0,38 ± 0,19	0,40 ± 0,23	0,29 ± 0,13	0,29 ± 0,11
Atividade $\Delta 9$ (18:1n9/18:0)	1,52 ± 0,76	1,88 ± 0,94	1,96 ± 1,13	1,45 ± 0,65	1,77 ± 0,67
Índice lipogênico (16:0/18:2n6)	2,86 ± 1,43	1,95 ± 0,98	3,77 ± 2,18	2,23 ± 1,0	1,80 ± 0,68
n3/n6	1,44 ± 0,34	0,89 ± 0,09	0,89 ± 0,09	0,89 ± 0,28	0,76 ± 0,14

Teste de Kruskal-Wallis. Média ± Erro Padrão (EPM); ^{abc} Letras distintas indica diferença significativa com valor de (p<0,05).

O perfil dos ácidos graxos da fração PE também apresentou alterações nos diferentes grupos experimentais (tabela 06), como no caso do ácido miristoleico (14:1n9), que apresentou as maiores porcentagens nos grupos HFCoa e HFCOAG comparado ao HFGos (p<0,05). Por outro lado, enquanto o ácido miristoleico apresentou um decréscimo no grupo HFGos, este mesmo grupo apresentou um incremento do ácido vacênico (18:1n7), que diferiu do HFCOAG e dos controles Nágua e HFágua (p<0,05).

O ácido linoleico (18:2n6) apresentou grandes porcentagens nos grupos HFGos e HFCOAG sendo diferente do controle Nágua e do tratamento HFCoa (p<0,05).

Foi observado ainda que houve uma diminuição significativa do ácido palmitoleico (16:1n9) no grupo HFágua em relação ao Nágua (p<0,05).

Tabela 07: Porcentagem dos principais ácidos graxos, atividade da dessaturase $\Delta 9$, índice lipogênico e razão n3/n6 da fosfatidilcolina (PC) do cólon de camundongos tratados com dieta normolipídica e hiperlipídica:

Fosfatidilcolina (PC)	Nágua	HFágua	HFCOA	HFGos	HFCOAG
Ácido mirístico (14:0)	5,17 ± 1,07 ^{ab}	4,26 ± 1,47 ^{ab}	4,93 ± 1,08 ^{ab}	3,76 ± 0,79 ^a	14,21 ± 9,17 ^b
Ácido miristoleico (14:1n9)	0,80 ± 0,55	0,95 ± 0,45	1,51 ± 0,71	1,17 ± 0,75	1,46 ± 0,68
Ácido pentadecanoico (15:0)	7,28 ± 0,64 ^a	4,55 ± 0,95 ^b	4,56 ± 1,04 ^b	4,50 ± 1,01 ^b	6,55 ± 0,85 ^{ab}
Ácido palmítico (16:0)	9,78 ± 4,89	12,79 ± 6,39	12,06 ± 4,93	11,37 ± 4,64	9,84 ± 4,40
Ácido palmitoleico (16:1n7)	2,78 ± 1,39 ^b	4,59 ± 2,29 ^a	3,34 ± 1,37 ^{ab}	2,28 ± 0,93 ^b	2,74 ± 1,22 ^{ab}
Ácido esteárico (18:0)	6,90 ± 3,45	7,75 ± 3,87	6,49 ± 2,65	6,62 ± 2,70	4,96 ± 2,22
Ácido vacênico (18:1n7)	1,86 ± 1,33	1,97 ± 0,73	1,49 ± 0,48	1,16 ± 0,46	1,60 ± 0,41
Ácido oleico (18:1n9)	4,41 ± 2,20 ^a	8,10 ± 4,05 ^{ab}	11,02 ± 4,5 ^b	9,00 ± 3,67 ^{ab}	9,83 ± 4,39 ^{ab}
Ácido linoleico (18:2n6)	5,79 ± 2,89	4,74 ± 2,37	6,51 ± 2,66	7,22 ± 2,95	5,75 ± 2,57
Ácido γ -linolênico (18:3n6)	1,99 ± 1,00	0,77 ± 0,38	0,86 ± 0,35	0,79 ± 0,32	0,76 ± 0,34
Ácido α -linolênico (18:3n3)	----	----	1,35 ± 0,55	----	----
Ácido araquídico (20:0)	3,66 ± 1,24	2,45 ± 0,32	2,71 ± 0,64	2,42 ± 0,53	2,35 ± 0,74
Ácido di-homo- γ -linoleico (20:3n6)	----	----	1,10 ± 0,45	1,11 ± 0,45	----
Ácido araquidônico (20:4n6)	----	----	7,33 ± 2,99	3,46 ± 1,41	0,13 ± 0,06
EPA (20:5n3)	6,07 ± 3,04	3,22 ± 1,61	1,91 ± 0,78	3,02 ± 1,23	1,96 ± 0,88
DHA (22:6n3)	0,24 ± 0,12	0,22 ± 0,11	1,59 ± 0,65	2,23 ± 0,91	0,29 ± 0,13
Atividade $\Delta 9$ (16:1n7/16:0)	0,25 ± 0,13	0,41 ± 0,21	0,34 ± 0,14	0,28 ± 0,1	0,29 ± 0,13
Atividade $\Delta 9$ (18:1n9/18:0)	0,76 ± 0,38	1,31 ± 0,66	1,96 ± 0,80	1,39 ± 0,57	2,42 ± 1,08
Índice lipogênico (16:0/18:2n6)	1,82 ± 0,91	3,23 ± 1,61	1,99 ± 0,81	1,58 ± 0,65	3,11 ± 1,39
n3/n6	1,17 ± 0,24	0,77 ± 0,18	0,77 ± 0,18	0,84 ± 0,19	1,04 ± 0,26

Teste de Kruskal-Wallis. Média ± Erro Padrão (EPM); ^{abc} Letras distintas indica diferença significativa com valor de (p<0,05).

Na fração PC (tabela 07), o ácido mirístico (14:0) apresentou a maior porcentagem no grupo HFCOAG em relação ao HFGos. O ácido pentadecanoico (15:0) foi maior no grupo Nágua, que diferiu de todos os grupos hiperlipídicos, exceto do HFCOAG (p< 0,05). Ainda com relação ao grupo Nágua, este apresentou um decréscimo do ácido oleico (18:1n9) que foi significativo em relação ao HFCoa (p<0,05). Já o grupo HFágua apresentou as maiores porcentagens do ácido palmitoleico (16:1n7) que diferiu do Nágua e do HFGos (p<0,05).

Observando a porcentagem da somatória total dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) (figura 09), verifica-se que os mesmos não diferiram significativamente entre os grupos experimentais nas frações SM e PE. Entretanto, algumas diferenças foram observadas na fração PC, na qual a somatória dos MUFAs mostrou-se maior no grupo HFágua em relação ao Nágua

($p < 0,05$). Por outro lado, a somatória dos PUFA na fração PC foi maior no grupo Nágua em relação ao HFágua e HFCOAG ($p < 0,05$). Observando os valores de ácidos graxos individuais, não foi possível identificar qual PUFA foi o mais expressivo para causar a diminuição de sua somatória no grupo HFCOAG em relação ao Nágua, já que não foi constatada nenhuma diferença significativa dos PUFA desse grupo em relação aos demais (tabela 07).

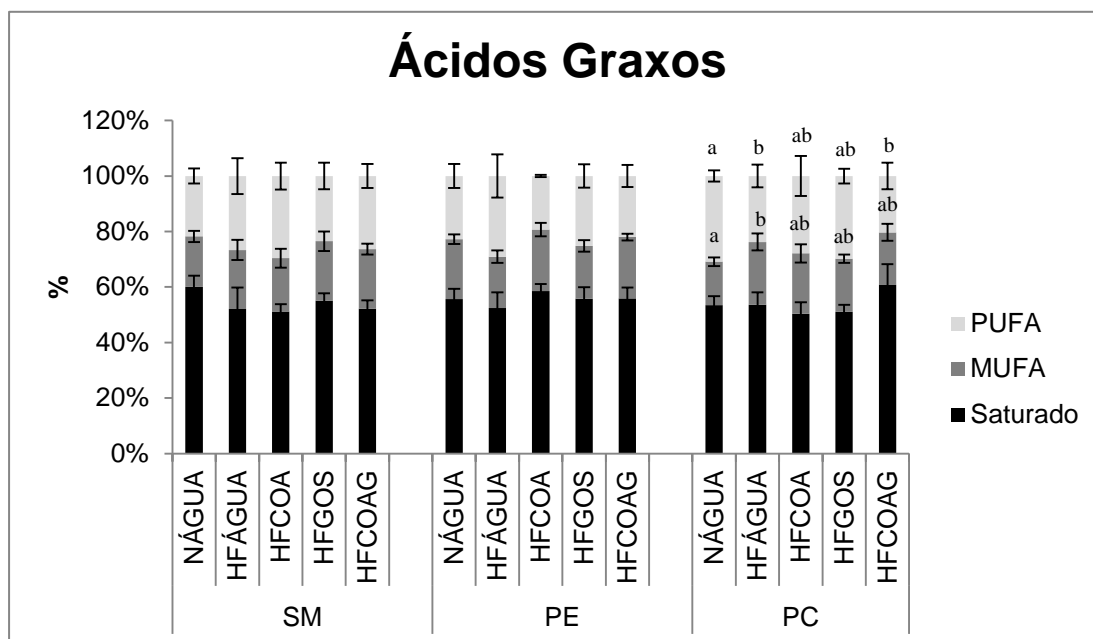


Figura 09 – Somatória dos ácidos graxos saturados, monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) totais nas classes: Esfingomielina (SM), Fosfatidiletanolamina (PE) e Fosfatidilcolina (PC) nos diferentes grupos experimentais. Teste de Kruskal-Wallis. Média \pm Erro Padrão (EPM); ^{ab} Letras distintas indica diferença significativa com valor de ($p < 0,05$).

5.3. Perfil Inflamatório no Tecido Intestinal

No duodeno, a IL-1 β apresentou a menor concentração no grupo HFágua, que diferiu dos grupos HFGos e HFCOAG ($P < 0,05$). Todavia, esse padrão não foi observado nos outros tecidos intestinais, ceco e cólon (figura 10).

A IL-1 β do ceco apresentou uma diminuição em todos os tratamentos hiperlipídicos (HFCoa, HFGos e HFCOAG) diferindo dos controles Nágua e HFágua ($p < 0,05$). Já no cólon, essa citocina apresentou um decréscimo significativo somente no HFGos comparado ao HF água ($p, 0,05$). Dessa forma foi possível observar que,

no ceco e cólon, há diminuição do IL-1 β nos tratamentos, sendo mais expressivo no grupo HFGos.

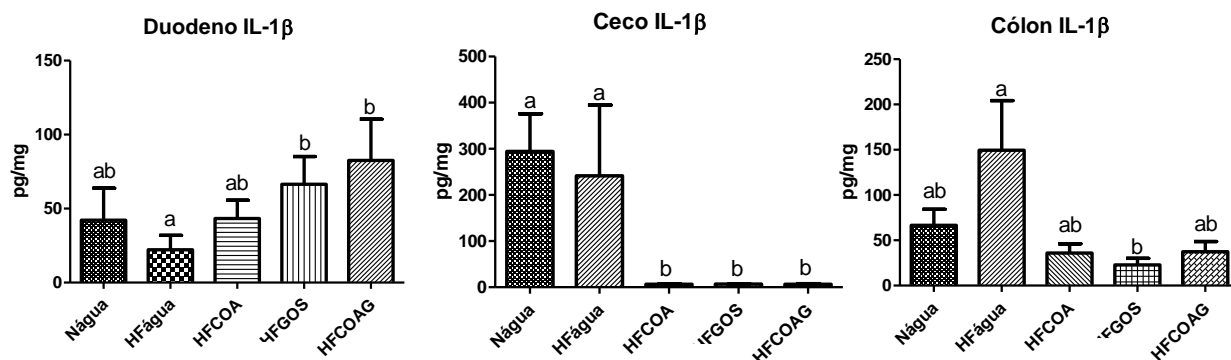


Figura 10 – Concentração da citocina IL-1 β no duodeno, ceco e cólon nos diferentes grupos experimentais. Teste de Kruskal-Wallis. Média \pm Erro Padrão (EPM); ^{ab} Letras distintas indica diferença significativa com valor de ($p < 0,05$).

No ceco, a IL-6 do grupo Nágua foi maior em relação aos grupos HFCoa e HFCOAG, demonstrando uma diminuição significativa dessa citocina pró-inflamatória nesses tratamentos ($p < 0,05$). Quando analisado somente os grupos hiperlipídicos, o HFCoa foi o que apresentou um decréscimo significativo em relação ao controle HFágua ($p < 0,05$) e ao grupo HFGos ($p < 0,05$), mas que não diferiu do grupo HFCOAG (figura 11).

Analisando a concentração da IL-6 no cólon, foi possível observar um aumento significativo dessa citocina no HFágua, que foi diferente dos demais grupos experimentais controle Nágua e tratamentos hiperlipídicos ($p < 0,05$).

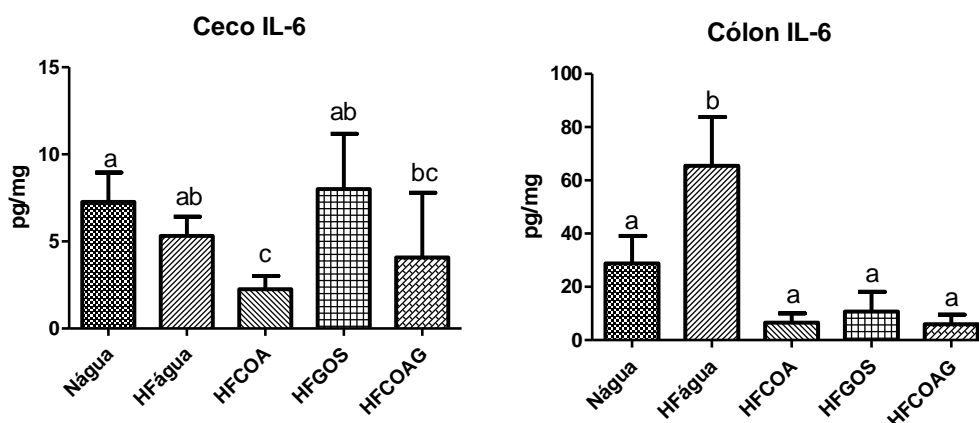


Figura 11 – Concentração da citocina IL-6 no ceco e colon nos diferentes grupos experimentais. Teste de Kruskal-Wallis. Média \pm Erro Padrão (EPM); ^{abc} Letras distintas indica diferença significativa com valor de ($p < 0,05$).

Apesar das diferenças nas concentrações dessa citocina nos diferentes tecidos, foi possível observar uma diminuição do IL-6 nos tratamentos, que foi mais expressivo no grupo HFCoa.

O TNF α do ceco no grupo HFCOAG apresentou uma concentração maior do que os grupos HFágua e HFCoa ($p<0,05$) porém não diferiu do controle Nágua e nem do HFGos. No cólon, não foi possível observar mudanças significativas dessa citocina entre os grupos (figura 12).

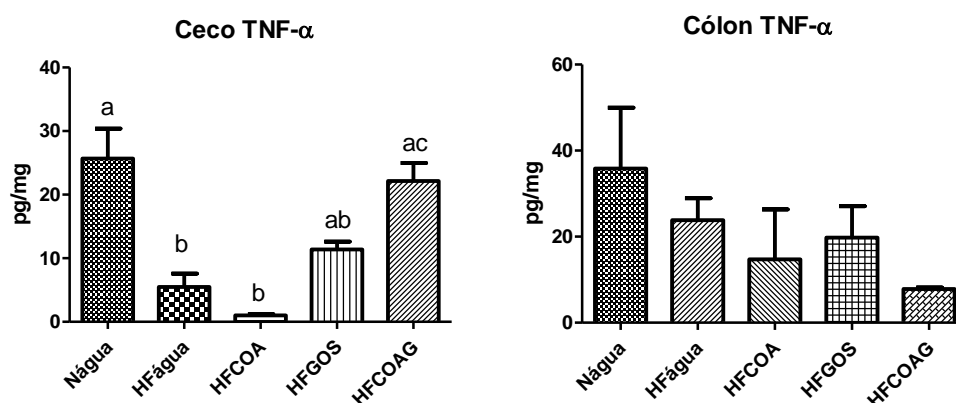


Figura 12 – Concentração da citocina TNF- α no ceco e cólon nos diferentes grupos experimentais. Teste de Kruskal-Wallis. Média \pm Erro Padrão (EPM); ^{abc} Letras distintas indica diferença significativa com valor de ($p<0,05$).

Ao contrário do que foi observado para o TNF- α , o IFN- γ não sofreu mudanças significativas no ceco, porém no cólon, apresentou um expressivo aumento no grupo HFGos, que diferiu significativamente de todos os outros grupos experimentais ($p<0,05$) (figura 13).

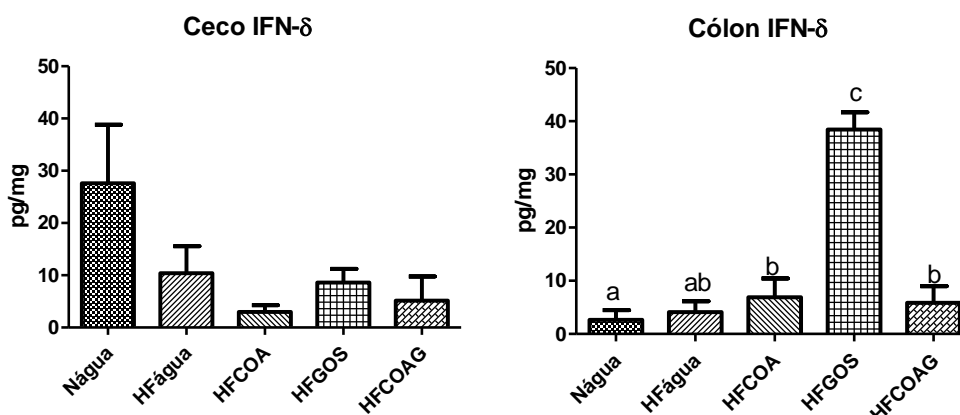


Figura 13 – Concentração da citocina IFN- γ no ceco e cólon nos diferentes grupos experimentais. Teste de Kruskal-Wallis. Média \pm Erro Padrão (EPM); ^{abc} Letras distintas indica diferença significativa com valor de ($p<0,05$).

A concentração de IL-10 anti-inflamatória do duodeno no grupo HFágua apresentou um decréscimo significativo em relação aos grupos Nágua e HFCOAG. A maior concentração dessa citocina foi observada no grupo Nágua, que além de diferir do grupo HFágua, diferiu também do grupo HFGos ($p < 0,05$) (figura 14). No ceco, essa citocina também foi menor no grupo HFágua, que diferiu para todos os grupos experimentais ($p < 0,05$). Dessa forma, observa-se um padrão a partir dessa análise, que a dieta hiperlipídica sem tratamento promove a diminuição dessa citocina no duodeno e no ceco, e que no cólon, não sofre alterações.

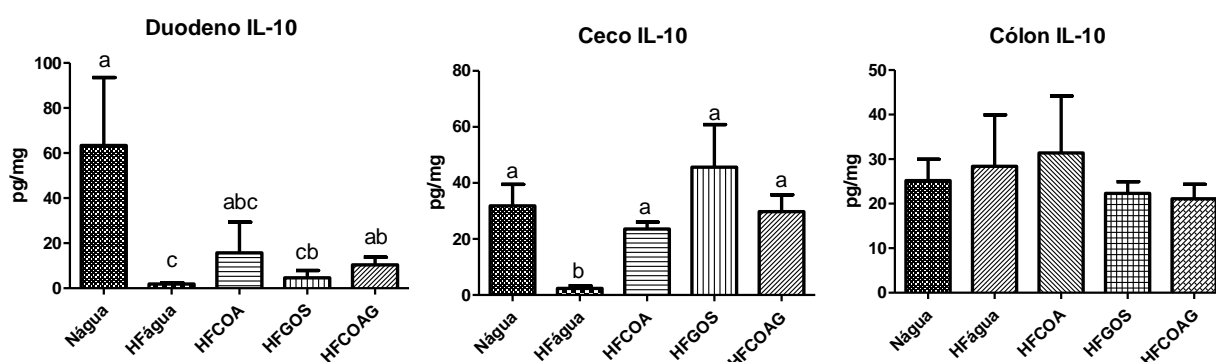


Figura 14 – Concentração da citocina IL-10 no duodeno, ceco e cólon nos diferentes grupos experimentais. Teste de Kruskal-Wallis. Média \pm Erro Padrão (EPM); ^{abc} Letras distintas indica diferença significativa com valor de ($p < 0,05$).

A razão IL-10/TNF α , que expressa a relação da atividade anti-inflamatória modulada por essas citocinas, apresentou o maior valor no grupo HFCoa, que diferiu dos controles Nágua e HFágua ($p < 0,05$), sem apresentar diferença quando comparado aos tratamentos HFGos e HFCOAG (figura 15). Dessa forma, entende-se que os grupos HFGos e HFCOAG, apesar de não diferir dos grupos controles, também não diferiu do tratamento que apresentou a melhor resposta anti-inflamatória no ceco.

No cólon, mesmo que a razão IL-10/TNF α não tenha diferido entre os grupos experimentais, nota-se que os maiores valores absolutos também foram obtidos no grupo HFCoa, mostrando uma tendência a uma melhor atividade anti-inflamatória e corroborando com os resultados observado no ceco para esse grupo.

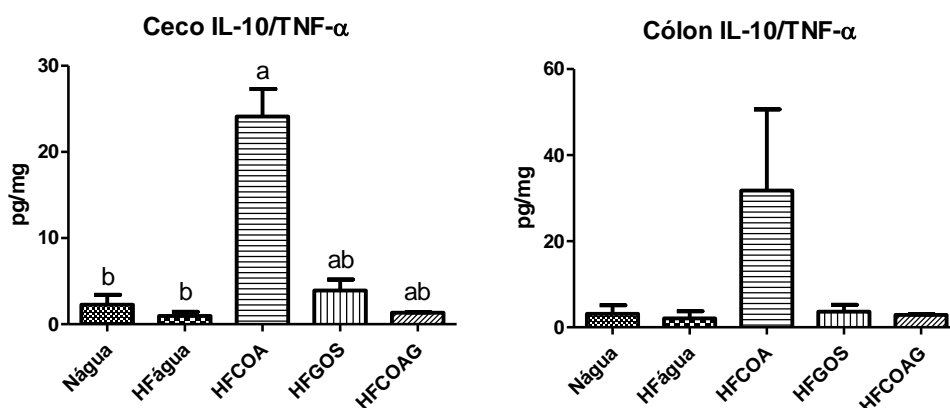


Figura 15 – Razão IL-10/TNF α no ceco e cólon nos diferentes grupos experimentais. Teste de Kruskal-Wallis. Média \pm Erro Padrão (EPM); ^{ab} Letras distintas indica diferença significativa com valor de ($p < 0,05$).

5.4. Determinação proteica por Western blotting – TLR4

A expressão proteica do receptor TLR4 no cólon não apresentou variações significativas entre os grupos experimentais, porém, analisando os valores absolutos dessa proteína, esta apresenta uma tendência de ser mais expressa no controle hiperlipídico HFágua, e menos expressa no grupo HFCoa (figura 16).

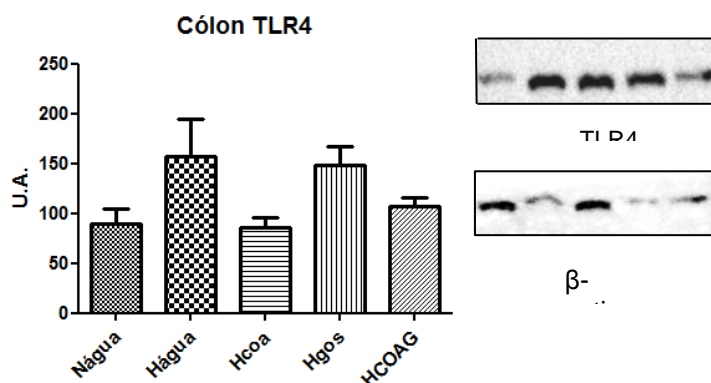


Figura 16 – Expressão da proteína TLR4 responsável pela via inflamatória do cólon, nos diferentes grupos experimentais. Teste de Kruskal-Wallis. Média \pm Erro Padrão (EPM);

5.5. Associação do Perfil de Ácidos Graxos e Citocinas Inflamatórias

A análise de correlação de Pearson demonstrou que algumas variáveis metabólicas estudadas apresentaram correlação entre si. No grupo HFCOAG, houve correlação positiva entre o IL10/TNF α e 18:2n6 da classe PE e correlação negativa

entre IL10/TNF α e 16:1n7 da classe PC sendo que esta última correlação negativa também se mostrou presente no grupo HFGos.

Tabela 08: Correlações entre as variáveis metabólicas IL10/TNF α , 18:2n6 da classe PE e 16:1n7 da classe Pc nos diferentes grupos experimentais (em negrito):

Correlação	Nágua – Cólon IL10/TNF α	HFágua – Cólon IL10/TNF α	HFCoa – Cólon IL10/TNF α	HFGos – Cólon IL10/TNF α	HFCOAG – Cólon IL10/TNF α
PE – 18:2n6	r= 0,5873 p= 0,4127	r= 0,3878 p= 0,6122	r= -0,6945 p= 0,3055	r= -0,0365 p= 0,9535	r= 0,9453 p=0,0152
PC – 16:1n7	r= -0,6520 p= 0,3480	r= 0,1806 p= 0,8194	r= -0,2310 p= 0,6597	r= -0,8261 p= 0,0427	r= -0,9268 p=0,0235

Teste de correlação de Pearson.

5.6. Análise da Microbiota intestinal

A partir da análise da composição microbiana das fezes dos animais considerando somente o tipo de dieta normolipídica (Nágua) e hiperlipídica (HFágua), verificou-se que as mesmas foram homogêneas entre as amostras a partir do teste *Permutation of multivariate homogeneity of groups dispersion*. Após a verificação da homogeneidade entre os grupos e a partir da análise estatística multivariada (PERMANOVA), constatou-se que a microbiota de camundongos obesos difere significativamente da microbiota de camundongos saudáveis ($p < 0,001$). Isso pode ser visualizado na figura 17, na qual a diversidade alfa baseada nos índices de diversidade de Shannon foi significativamente maior na dieta hiperlipídica ($p < 0,001$).

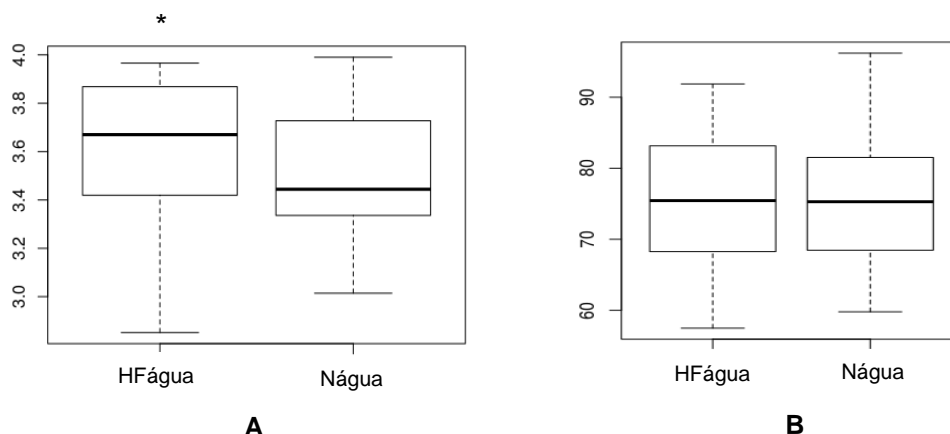


Figura 17: (A) Índice de diversidade de Shannon das bactérias intestinais de animais submetidos a dieta hiperlipídica (HFágua) e normolipídica (Nágua). (B) Riqueza das bactérias intestinais de animais submetidos a dieta hiperlipídica e normolipídica. PERMANOVA test. * indica diferença significativa com valor de $p < 0,001$.

A figura 18 representa a composição média da microbiota tomando-se como especificação o Filo e a Classe. Analisando os diferentes Filos de bactérias que compõem a microbiota dos animais, os mais representativos foram: Bacteroidetes, Deferribacteres, Firmicutes, Proteobacteria e Verrucomicrobia. Os filos Firmicutes, Proteobacteria e Deferribacteres apresentaram um expressivo aumento no grupo HFágua e concomitante diminuição dos Filos Bacteroidetes e Verrucomicrobia quando comparado ao Nágua.

Dentro do Filo Firmicutes, as classes Clostridia e Erysipelotrichi foram as responsáveis por esse aumento, porém observou-se uma diminuição da classe Bacilli, que também faz parte do Filo Firmicutes. As classes Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria foram as que aumentaram dentro do Filo Proteobacteria. Já a classe Deferribacteres foi a responsável pelo aumento observado do Filo Deferribacteres.

Com relação aos Filos que apresentaram redução da microbiota no grupo HFágua, a classe Bacterioidea (Filo Bacteroidetes) e Verrucomicrobiae (Filo Verrucomicrobia) foram as mais representativas.

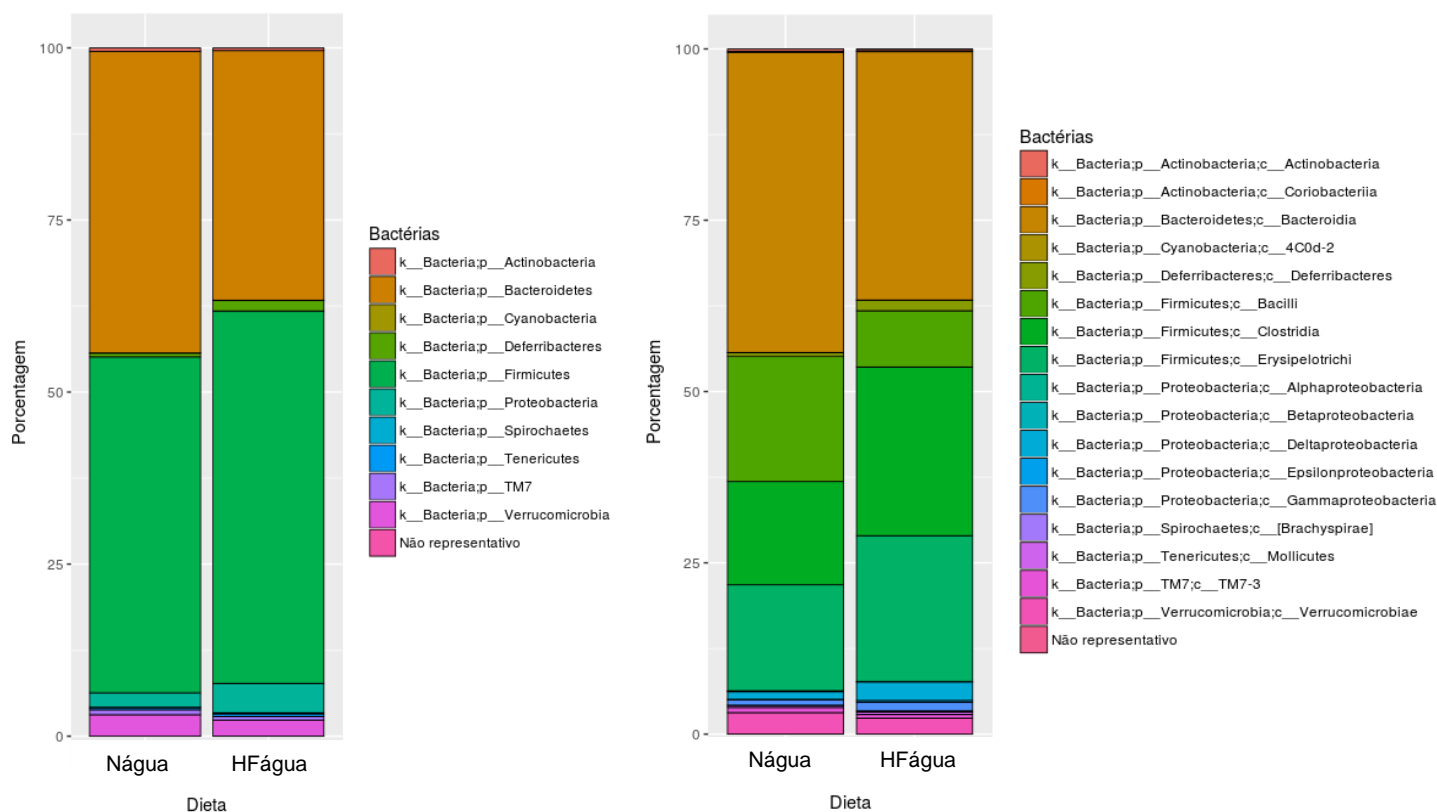


Figura 18: Composição média dos Filos e Classes de bactérias da microbiota intestinal de animais submetidos à dieta hiperlipídica (HFágua) e normolipídica (Nágua).

Considerando os tratamentos e comparando-os contra o grupo normolipídico (PERMANOVA), verificou-se que a microbiota do grupo HFGos e HFCoa diferiram do Nágua ($p < 0,065$ e $p < 0,003$ respectivamente), entretanto a microbiota do grupo HFCOAG não apresentou diferença do controle saudável. Isso pode ser observado na análise de agrupamento, que há a formação de dois grupos principais (figura 19). Com exceção da composição microbiana dos do grupo HFCOAG, as outras composições hiperlipídicas se afastaram da normal, mostrando que de forma geral há diferença nessa composição e, nitidamente, o destaque do tratamento HFCOAG.

Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para comparar a abundância relativa de gêneros de bactérias entre as diferentes microbiotas. Foram encontradas 257 espécies que estão dentro de 32 gêneros de bactérias com valor significativo ($p < 0.05$) quanto à diferença de composição, as quais podem ser observadas na figura 19.

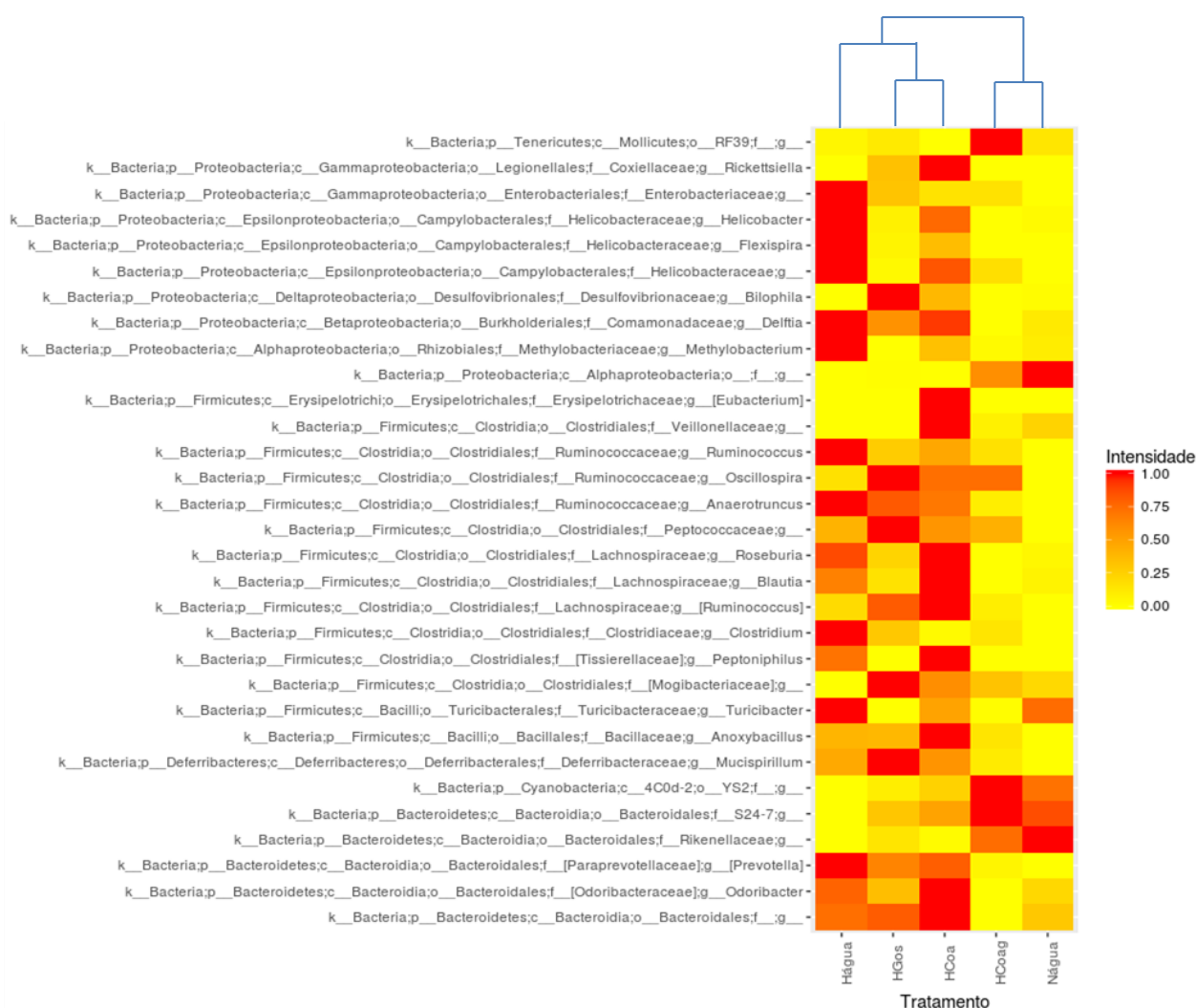


Figura 19: Composição média dos gêneros de bactérias da microbiota intestinal de animais submetidos a dieta normolipídica (Nágua) e hiperlipídica tratados ou não (HFágua, HFCoa, HFGos e HFCoag). Teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

Podemos observar pelo *heatmap* que somente os gêneros *Oscillospira* (Classe Clostridia), *Turicibacter* (Classe Bacilli) e um gênero não identificado pertencente à classe Mollicutes no grupo HFCoag não se mostraram próximos ao grupo Nágua. Todavia, os gêneros restantes apresentaram uma abundância relativa semelhante ao Nágua quando comparado com os demais grupos.

Tomando como base os resultados da PERMANOVA, que mostrou que a composição da microbiota do grupo HFCoag não foi diferente do grupo Nágua, aliado a proximidade da abundância dos gêneros desse grupo ao Nágua, é importante agora reconhecer no que ele difere do grupo que possui a mesma dieta sem tratamento (controle), já que este se apresentou estatisticamente diferente do Nágua.

Na tabela 09 estão apresentadas as análises de porcentagem de similaridade (SIMPER) das bactérias encontradas com pelo menos 1% de contribuição para a dissimilaridade entre o controle hiperlipídico e o HFCOAG. É possível perceber que as bactérias mais distantes entre os dois grupos são da ordem Clostridiales, família Lachnospiraceae (gênero não identificado)

Tabela 09: Abundância relativa dos gêneros de bactérias mais representativas nos grupos HFágua e HFCOAG e as porcentagens de dissimilaridade entre eles.

OTUs	Abundancia Relativa HFágua (%)	Abundancia Relativa HFCOAG (%)	% dissimilaridade
k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__	2,54%	7,42%	7,69%
k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__; g__	0,45%	5,80%	7,65%
k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__	8,22%	11,63%	7,49%
k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Porphyromonadaceae; g__Porphyromonas	2,34%	6,19%	6,17%
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Alphaproteobacteria; o__Caulobacterales; f__Caulobacteraceae; g__	0,03%	4,17%	5,81%
k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__; g__	10,65%	4,28%	5,41%
k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__; g__	0,08%	3,34%	4,60%
k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Lachnospiraceae; g__Blautia	5,31%	1,60%	3,45%
k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__Oscillospira	2,64%	0,23%	2,51%
k__Bacteria; p__Acidobacteria; c__Acidobacteriia; o__Acidobacteriales; f__Acidobacteriaceae; g__	0,00%	1,55%	2,18%
k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__Oscillospira	2,62%	0,64%	1,92%
k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__; g__; s__	0,53%	1,68%	1,80%
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Moraxellaceae; g__Acinetobacter	1,96%	0,32%	1,64%
k__Bacteria; p__Tenericutes; c__Mollicutes; o__RF39; f__; g__	7,10%	4,29%	1,60%
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Pseudomonadaceae; g__Pseudomonas	0,00%	1,11%	1,55%
k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Bacilli; o__Lactobacillales; f__Lactobacillaceae; g__Lactobacillus	0,18%	1,18%	1,46%

k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__	1,52%	0,24%	1,28%
k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Clostridiaceae; g__Candidatus Arthromitus	0,01%	0,92%	1,28%
k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__Ruminococcaceae; g__	0,25%	0,97%	1,09%
k__Bacteria; p__Firmicutes; c__Clostridia; o__Clostridiales; f__; g__	0,13%	0,86%	1,07%
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pseudomonadales; f__Pseudomonadaceae; g__Pseudomonas; s__veronii	1,26%	0,21%	1,06%
k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Pasteurellales; f__Pasteurellaceae; g__Haemophilus__	1,08%	0,11%	1,00%

OTU: Unidade operacional taxonômica.

5.7. Associação da Microbiota com os Parâmetros Metabólicos

A análise correlação de Spearman entre a microbiota do cólon e os parâmetros metabólicos revelaram a existência de determinados táxons de bactérias associados positivamente ou negativamente com as variáveis. Na tabela e na figura a seguir estão representadas as associações que se mostraram correlacionadas entre si.

Tabela 10: Associações entre as bactérias intestinais com as variáveis fisiológicas do cólon:

Bactérias	Variáveis fisiológicas (cólon)	
Cyanobacteria – YS2 (↑)	(↑) SM 14:1n9 $r = 0,91$; $p = 0,05$	-----
Bacteroidetes – S24-7 (↑)	(↑) PE 16:1n7 $r = 0,95$; $p = 0,05$	(↑) PC 15:0 $r = 0,92$; $p = 0,05$
Firmicutes – Mogibacteriaceae (↑)	(↑) SM 18:1n7 $r = 0,92$; $p = 0,05$	(↓) IL-6 $r = -0,872$; $p = 0,054$
Firmucutes – <i>Turicibacter</i> (↓)	↑ PE 18:1n7 $r = -0,93$; $p = 0,05$	↑ IFN γ $r = -0,94$; $p = 0,05$
Deferribacteres – <i>Mucispirillum</i> (↑)	↑ PE 18:1n7 $r = 0,91$; $p = 0,05$	-----
Proteobacteria – <i>Bilophila</i> (↑)	↑ IFN γ $r = 0,92$; $p = 0,05$	-----

Teste de correlação de Spearman.

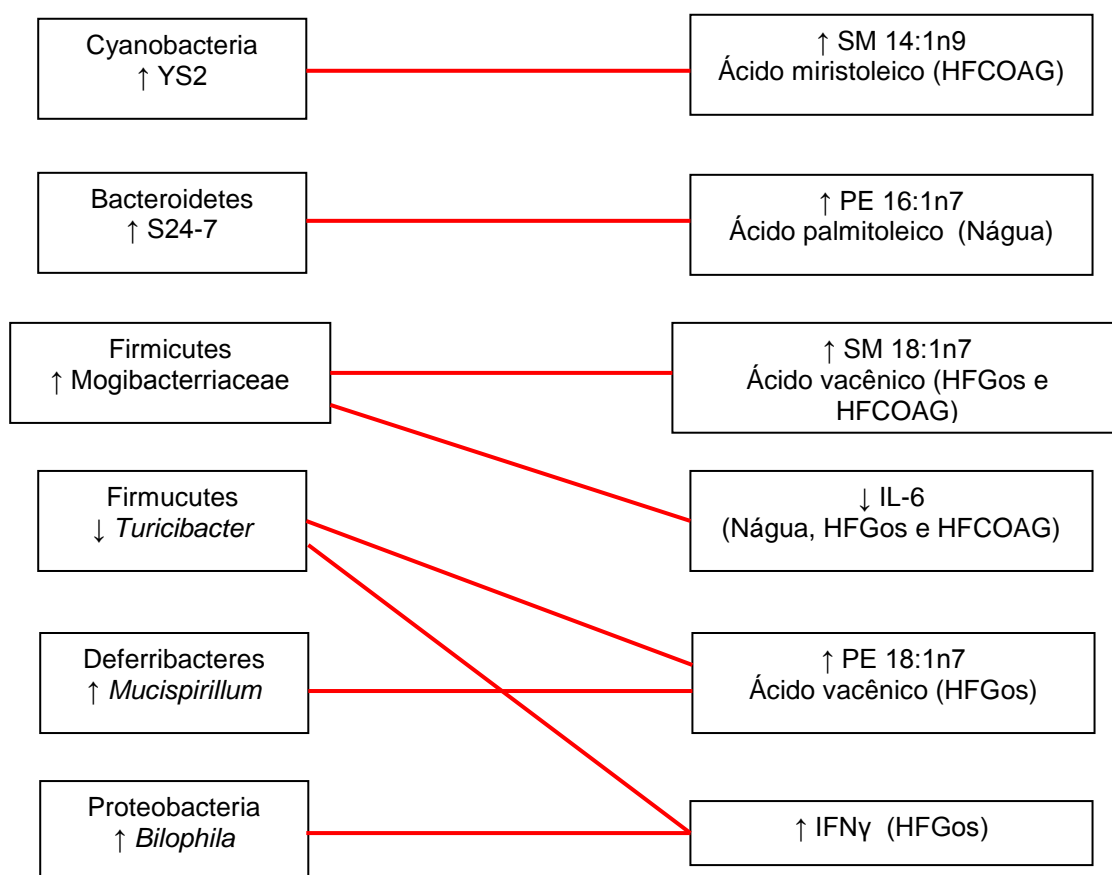


Figura 20: Associação entre os táxons da microbiota do cólon correlacionados com as variáveis fisiológicas.

6. DISCUSSÃO

A obesidade é consequência de um balanço energético positivo gerado por fatores ambientais, como o consumo excessivo de alimentos calóricos e o sedentarismo (TSCHÖP; HEIMAN, 2001). Dentre as diversas possibilidades para a indução à obesidade, a dieta hiperlipídica com altos níveis de gordura saturada é preferencialmente utilizada para obter um modelo consistente de obesidade induzida por dieta, e assim ser viável para o estudo das alterações metabólicas presentes na obesidade. Animais de laboratório, principalmente roedores, são muito utilizados como modelo de indução à obesidade devido à sua grande semelhança com as respostas metabólicas decorrentes do processo obesogênico. A partir do que é descrito em literatura sobre as mudanças metabólicas e deletérias associadas à obesidade, esse estudo teve como finalidade verificar se a utilização do coacervado de proteínas do soro de leite (Coa) e de galactooligossacarídeo (Gos), ambos produtos que podem ser obtidos a partir do soro de leite, possuem um caráter preventivo contra os processos obesogênicos.

Durante o ensaio experimental, os dados biométricos aferidos semanalmente já puderam evidenciar mudanças de ganho de massa corporal nos grupos HFágua e HFGos nas últimas duas semanas de experimento (figura 06), demonstrando que o período de 16 semanas de tratamento com a ração hiperlipídica foi suficiente para indução da obesidade.

Na dieta hiperlipídica, a banha de porco foi o tipo de gordura utilizada para composição desta dieta, sendo esta, segundo (BUETTNER et al., 2006), a mais recomendada para geração de um modelo válido de roedor obeso com alterações metabólicas, já que as gorduras saturadas e monoinsaturadas são capazes de promover de forma mais pronunciada, de gerar aumento da lipogênese e depósito de microvesículas no fígado. Nossos resultados mostraram que o tratamento com dieta hiperlipídica por 16 semanas foi efetivo na indução do ganho de massa corporal como o esperado para esses animais. Esse padrão foi observado em diversos estudos, utilizando diferentes modelos experimentais como ratos *Wistar* (DA SILVA et al., 2010), camundongos *swiss* (SOUZA, 2013; WHITE et al., 2013) e em roedores da linhagem *Spragle-Dawley* (DOBRIAN et al., 2000), sendo possível observar em todos eles, um modelo viável e reprodutível de obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

LIN et al., (2000), utilizando essa mesma linhagem de camundongo C57BL6 e dieta hiperlipídica com 58,7% de lipídeos, constatou um aumento gradual da massa corpórea diferindo significativamente após 8 semanas de tratamento. Além do aumento de peso, esses autores constataram também que as alterações metabólicas iniciaram-se a partir de 8 semanas aumentando drasticamente com 15 semanas. SOUZA, (2013), utilizando a mesma composição de dieta hiperlipídica administrada nesse estudo, constatou um aumento significativo de massa corpórea na 6ª e 8ª semana de tratamento quando comparado ao grupo controle normolipídico, porém em uma linhagem diferente, utilizando camundongos swiss. Isso demonstra que, mesmo utilizando uma dieta hiperlipídica com o mesmo percentual de lipídeos derivado da mesma fonte de gordura, a linhagem utilizada demonstra uma influência substancial no tempo necessário ao aumento de massa corpórea e nas alterações metabólicas proporcionadas pela dieta.

Outro aspecto importante de validação desse modelo de indução à obesidade são os resultados de eficiência energética desses animais. Mesmo os animais do controle Nágua tendo consumido uma quantidade muito maior de ração em gramas comparado ao controle HFÁgua e seus tratamentos, quando realizado o cálculo de eficiência energética, os grupos HFÁgua, HFCoa e HFGos foram maiores significativamente em relação ao controle Nágua (tabela 04). Isso significa que esses grupos, apesar de terem tido uma menor ingesta de ração, tiveram maior eficiência em converter a mesma quantidade em calorias em maior massa corpórea.

Os tratamentos HFCoa e HFCOAG não apresentaram ganho de massa corpórea significativa dos controles Nágua e HFÁgua (tabela 04), porém o HFCOAG foi o único que demonstrou menor ganho de adiposidade (Σ TAB) comparado ao seu controle HFÁgua (figura 7-D), demonstrando que não houve aumento de massa significativo nem tampouco aumento de adiposidade. Desse modo o COAG promove um suposto efeito preventivo na modulação da massa corpórea e de tecido adiposo mesmo consumindo uma dieta obesogênica, provavelmente a partir da mudança constatada na microbiota intestinal, no perfil dos ácidos graxos de membrana do cólon e da inflamação.

Vários estudos demonstraram uma forte associação entre o microbioma intestinal e a regulação do peso corporal gerando evidências da influência da

microbiota na mudança das funções metabólicas na obesidade (TURNBAUGH; GORDON, 2009; PETRIZ et al., 2014; CLARKE et al., 2012; DUNCAN et al., 2008).

A microbiota normal do intestino apresenta uma elevada densidade de microrganismos, sendo geralmente os filos Firmicutes, Bacteroidetes os mais abundantes seguidos pelos filos Proteobacteria, Actinobacteria e pelos filos Verrucomicrobia e Fusobacteria em menores quantidades (CHAKRABORTI, 2015).

Verificamos que a dieta hiperlipídica aumentou significativamente a diversidade α e alterou a abundância relativa de determinados grupos de bactérias da microbiota do cólon (figuras 17 e 18). Houve um aumento do Filo Firmicutes, Deferribacteres e Proteobacteria e diminuição dos filos Bacteroidetes e Verrucomicrobia, o que vai de acordo com o que é citado por diversos autores (CHAKRABORTI, 2015; SUN; CHANG, 2014; TREMAROLI; BÄCKHED, 2012; CLARKE et al., 2012). As classes Clostridia e Erysopelotrichi foram as responsáveis pelo aumento observado do filo Firmicutes na dieta hiperlipídica (figura 18) sendo que essas classes estão relacionadas com o desenvolvimento de síndrome metabólica tanto em humanos como em animais obesos (WOTING et al., 2014).

Assume-se a princípio que, na grande maioria, a obesidade parece estar relacionada com a diminuição da abundância intestinal de Bacteroidetes com elevada abundância de Firmicutes, mesmo que alguns estudos apresentem resultados contraditórios a esse, como visto por DUNCAN et al., (2008) e KIM et al., (2012), que não encontraram nenhuma diferença na proporção desses dois filos em indivíduos magros e obesos.

A diversidade α presente na microbiota intestinal foi maior nos animais submetidos à dieta hiperlipídica e menor nos animais tratados com dieta normolipídica, o que contraria vários resultados relatados em pesquisas com dieta hiperlipídica (DUCA et al., 2014; PETRIZ et al., 2014; CAESAR et al., 2015; CHAKRABORTI, 2015). KIM et al., (2012) não encontraram diferença significativa da diversidade alfa entre camundongos alimentados com dietas normo e hiperlipídicas e QIN et al., (2012) também não observaram mudança na diversidade entre indivíduos diabéticos e não diabéticos. Mesmo que em nosso estudo a diversidade alfa tenha sido maior no grupo HFágua, a diferença da abundância relativa dos táxons beneficiadas pela dieta hiperlipídica é que estão refletindo, na verdade, na condição metabólica que foi observada nesse grupo, pelos dados de adiposidade, inflamação e até na diminuição da massa relativa do tecido intestinal.

KIM et al., (2012) observaram que houve diminuição da massa relativa do cólon e elevada síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF α , IL-1 β e IL-6, assim como aumento da expressão do receptor TLR4 em animais submetidos à dieta hiperlipídica, associando esses eventos à dieta administrada. Em nosso estudo, o controle HFÁgua também apresentou uma diminuição da massa relativa do duodeno e cólon, entretanto, quando observamos os tratamentos, ambos os tecidos não diferiram em suas massas do controle NÁgua.

HABIB et al., (2011) constataram um aumento da massa cecal em ratos diabéticos tratados com farinha de yacon rica em FOS (frutooligossacarídeo) e associaram essa mudança como uma evidência da alteração positiva da microbiota nesses tecidos decorrente do uso de prebióticos. Esses resultados foram observados no ceco para os grupos Gos e COAG, ambos tratados com prebióticos, porém a análise metagenômica da microbiota não foi realizada nesse tecido. Mesmo não tendo a análise da microbiota do ceco, pressupomos que a modulação na microbiota pelo uso de prebióticos existe, e essa alteração pode levar a alteração da massa relativa dos tecidos intestinais.

No cólon, os resultados da metagenômica nos mostraram que alguns grupos de bactérias como *Clostridium* e Enterobacteriaceae presentes no HFÁgua diminuíram ou quase desapareceram nos tratamentos, um aspecto considerado positivo (figura 19). Essas bactérias, ambas gram-negativas, são características do cólon e sua alta abundância desencadeada pela dieta hiperlipídica podem estar relacionadas à quebra da barreira epitelial do cólon, desencadeando os efeitos inflamatórios sistêmicos característicos da obesidade.

Com relação aos efeitos inflamatórios no tecido intestinal, pudemos observar que houve uma mudança no perfil das citocinas pró-inflamatórias, que de uma forma geral, diminuíram nos tratamentos em relação ao HFÁgua. Com exceção do IFN γ , que aumentou consideravelmente no cólon do grupo HFGos, IL-1 β e IL-6 diminuíram em todos os tratamentos no ceco e no cólon respectivamente e a citocina anti-inflamatória IL-10 no ceco aumentou nos tratamentos. A IL-6 também apresentou diminuição no ceco somente para o grupo HFCoa em relação ao HFÁgua e NÁgua e isso pode estar relacionado com a presença dos peptídeos bioativos como α -lactalbumina e β -lactoglobulina presentes no Coa, que por si só já suprime a atividade inflamatória pela liberação de citocinas. YAMAGUCHI; UCHIDA, (2007) aplicaram diferentes doses desses peptídeos diretamente no duodeno de ratos

Sprague-Dawley após indução de isquemia e concluíram que as proteínas do soro do leite suprimem a liberação de IL-6, sendo α -lactalbumina o peptídeo mais potente em diminuir a produção dessa citocina. Os autores associaram essa diminuição com o mecanismo mediado pelo óxido nítrico (NO), que suprime a produção de IL-6 a partir da inibição do complexo NF- κ B/I κ B e sugeriram que α -lactalbumina possa ser utilizada como uma droga natural para pacientes que precisam tomar anti-inflamatórios decorrente de doenças com inflamação severa. Esses resultados podem, em parte, explicar o que foi visto neste trabalho, onde as concentrações de IL-6 do ceco no grupo tratado com Coa foi mais eficiente, inclusive em relação ao controle Nágua, em diminuir a liberação dessa citocina. Presume-se nesse caso, que os peptídeos estejam chegando intactos nessa porção intestinal e que o processo de coacervação das proteínas do soro do leite foi efetivo em manter a integridade dessas moléculas.

Além das citocinas, observamos também uma mudança no perfil dos ácidos graxos das diferentes classes de lipídeos de membrana do cólon nos tratamentos. Os ácidos graxos advindos da dieta podem ser metabolizados e sofrer alterações no cólon e a disponibilidade deles podem alterar a composição das membranas celulares, demonstrando que a dieta é um forte fator de influência no perfil dos ácidos graxos do cólon.

Alguns ácidos graxos da dieta que não são absorvidos e que chegam ao cólon são expostos a uma população de bactérias anaeróbicas que hidrogenam os PUFA para seus saturados homólogos (HOWARD; HENDERSON, 1999; DEVILLARD et al., 2007). Alguns ácidos graxos, em especial os conjugados do ácido linoleico (CLA) podem ser formados por bactérias intestinais, como demonstrado em ratos e em humanos (HOWARD; HENDERSON, 1999). Os CLA apresentam atividades anti-inflamatórias sobre os colonócitos e dessa forma podem ser usados em terapias para as doenças inflamatórias intestinais (HONTECILLAS et al., 2002). Trabalhos mais recentes ainda relacionam os CLA como prebióticos devido às evidências benéficas à saúde do hospedeiro (GIBSON et al., 2017).

Em nosso estudo observamos algumas diferenças na proporção de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e dos polinsaturados (PUFA) na porção PC da membrana entre os animais alimentados com dieta normolipídica e hiperlipídica, o que evidencia uma modulação da dieta na composição dos ácidos graxos de membrana. A Σ MUFAs foi maior no grupo HFáguas do que no Náguas e esse aumento

foi em detrimento da porcentagem de Σ PUFAs enquanto que os mesmos aumentaram no grupo Nágua. Quando analisamos os MUFAs individuais, observamos que essa diferença se deu pelo aumento do ácido palmitoleico (16:1n7) enquanto que para os PUFAs individuais não foi possível identificar qual ácido graxo promoveu essa mudança. Todavia, os ácidos graxos linoleico (18:2n6), γ -linolênico (18:3n6) e EPA (20:5n3) demonstraram um decréscimo de seus valores absolutos no grupo HFágua em relação ao Nágua, que mesmo estes não apresentando diferença estatística significativa entre os grupos controles, possivelmente influenciaram no resultado quando realizado a Σ PUFAs.

Esses ácidos graxos estão de acordo com o que foi observado em pesquisas que demonstraram que as desordens associadas à resistência à insulina como a diabetes, obesidade e doenças coronárias estão associadas a uma alta proporção de ácido palmítico (16:0) e ácido palmitoleico (16:1n7), baixos níveis de LA (18:2n6), alta proporção do ácido di-homo- γ -linoleico (20:3n6) e sem apresentar diferenças entre o AA (20:4n6), EPA (20:5N3) e DHA (22:6N3) na composição das membranas celulares (VESSBY; TENGBLAD; LITHELL, 1994; DECSI et al., 2000).

O oposto foi observado para alguns ácidos graxos no tratamento HFGos, como baixas porcentagens de 16:1n7 na classe PC em relação ao seu controle hiperlipídico com concomitante aumento do 18:2n6 na classe PE em relação ao seu controle normolipídico. Isso demonstra uma modulação positiva na composição dos ácidos graxos desse grupo. Aliado a isso, não foi observada alterações na atividade da enzima $\Delta 9$ nesse e em nenhum outro grupo experimental, uma vez que uma alta atividade dessa enzima está associada com as disfunções metabólicas observadas na obesidade.

Esses resultados, juntamente com a correlação negativa observada entre o ácido palmitoleico da classe PC com o IL10/TNF α do cólon no grupo HFGos evidenciam que o tratamento com o Gos está modulando a composição dos fosfolipídeos de membrana com a diminuição do ácido palmitoleico e que isso diretamente reflete em um aumento na atividade anti-inflamatória no cólon. A análise da microbiota nos revela ainda que a bactéria *Mucispirillum* apresentou uma alta abundância relativa no grupo HFGos e se correlacionou positivamente com o ácido vacênico (18:1n7), que também demonstrou uma alta concentração na classe PE nesse grupo (tabela 06). O ácido vacênico é um dos subprodutos (CLA) (TRICON et al., 2005) originados da metabolização do ácido linoleico o que sugere que o efeito

prebiótico do Gos esteja aumentando a colonização dessa bactéria no cólon, e que a mesma esteja metabolizando o ácido linoleico formando o ácido vacênico. Isso evidencia que há uma disponibilidade do ácido linoleico para ser metabolizado no cólon, pois as porcentagens de ácido linoleico e vacênico na classe PE se mostraram bastante elevadas.

Existem inúmeras evidências de que os conjugados do ácido linoleico produzidos por determinadas bactérias intestinais exercem diferentes efeitos fisiológicos no hospedeiro. Os benefícios em potencial da formação desses conjugados no cólon humano podem ser utilizados em terapias contra doenças inflamatórias intestinais e como profilático do câncer de cólon (TRICON et al., 2005).

NEYRINCK et al., (2011) encontrou em seu estudo que *Roseburia* spp e *Butyrovibrio* são as bactérias intestinais envolvidas no metabolismo do ácido linoleico que formam o ácido vacênico e observou que esse acúmulo foi positivo na saúde dos pacientes. Entretanto, em nosso estudo, verificamos que a abundância relativa de *Roseburia* foi baixa nos grupos HFGos e HFCOAG, o que não explicaria o aumento observado do ácido vacênico nesses grupos.

O ácido linoleico (18:2n6) é o precursor do ácido araquidônico (AA – 20:4n6) e este, quando apresenta alta disponibilidade, é recrutado da membrana plasmática para formar eicosanoides, que são mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, leucotrienos, prostaciclina e tromboxanos. As prostaglandinas compreendem muitos subtipos, os quais possuem diferentes funções. A prostaglandina E (PGE) tem sido amplamente investigada, em função do seu importante papel como imunomoduladora. Entre os tromboxanos, apenas o tromboxano A (TXA) é ativo, sendo o TXB inativo. Os metabólitos formados a partir de ácido araquidônico (o precursor mais importante) recebem um sufixo “2” (PGE₂, TXA₂, PCI₂) (MATTOS; ANDRADE, 2006). A PGE₂ aumenta os níveis de AMPc em linfócitos T e B suprimindo as respostas inflamatórias e diminuindo a apresentação de antígenos em macrófagos (KONIG et al., 1997).

O ácido linoleico, além de apresentar alta porcentagem no grupo HFGos, também mostrou-se elevado no HFCOAG na classe PE quando comparado com o controle saudável (Nágua). A maior disponibilidade do 18:2n6 nesses grupos reflete em uma maior chance em formar AA, com consequente produção de PGE₂, que a partir da sua ação em aumentar o AMPc em macrófagos, leva a uma diminuição na apresentação de antígenos e consequentemente diminuindo a produção de citocinas

pró-inflamatórias, como observado para o IL-6 e IL-1 β (somente para o HFGos). Esses resultados são subsidiados ainda pela correlação positiva encontrada entre o ácido linoleico da classe PE com a IL-10/TNF α do cólon no tratamento HFCOAG, confirmando para esse grupo que a maior porcentagem do ácido linoleico reflete em um melhor estado anti-inflamatório. Esses resultados condizem com pesquisas que relacionam as altas concentrações de 18:2n6 nas membranas com a melhora do quadro da obesidade (DECSI et al., 2000).

O ácido vacênico (18:1n7) foi o ácido graxo presente na porção SM que apresentou um aumento em todos os tratamentos quando comparado com o controle hiperlipídico, porém sem diferir do grupo controle normolipídico. Como a presença da SM presente na membrana está diretamente relacionada com as balsas lipídicas, e considerando a função das balsas em ancorar receptores proteicos relacionados com o processo inicial da inflamação, presume-se que os tratamentos estejam modulando a constituição da SM a partir do ácido vacênico, e isso pode estar influenciando na ativação das balsas.

Os lipídeos são importantes constituintes das balsas lipídicas, que são pontos de controle da membrana plasmática que ocorrem eventos biológicos como sinalização, seleção e tráfico de moléculas, adesão celular, migração, entrada de patógeno e respostas imunes. Alterações na composição dos lipídeos de membrana podem ocasionar mudanças na estrutura e função das balsas. Assume-se que a modulação das balsas a partir da dieta pode ser um tratamento promissor para doenças associadas às membranas (MICHEL; BAKOVIC, 2007).

Em nosso estudo, a classe SM, sem dúvida, é a porção que mais está relacionada com a formação das balsas lipídicas, uma vez que as mesmas possuem assimetria na composição dos lipídios que as perfazem, com as esfingomielinas e glicoesfingolipídeos abundantes na camada externa e com as fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina abundantes na camada citoplasmática. O colesterol é presente preenchendo os espaços entre as camadas (SIMONS; IKONEN, 1997).

Nas balsas lipídicas, o ácido palmítico é o saturado predominante entre todos os ácidos graxos, e os insaturados são quase ausentes devido aos problemas estáticos causados pelas insaturações, desestruturando as balsas e consequentemente a sua ativação (MICHEL; BAKOVIC, 2007).

Pesquisas com macrófagos de camundongos RAW264.6 demonstraram que os ácidos graxos presentes em grandes quantidades tanto em membranas

plasmáticas quanto em balsas lipídicas de macrófagos são: ácido oleico (18:1n9), ácido vacênico (18:1n7), ácido palmitoleico (16:1n7), ácido esteárico (18:0), ácido palmítico (16:0) e ácido mirístico (14:0) em animais que receberam dieta normal, porém quando a dieta foi suplementada com PUFA n3 e n6, os macrófagos apresentaram um aumento desses ácidos graxos nas balsas lipídicas em detrimento principalmente do ácido vacênico e ácido oleico. Essa mudança interfere diretamente na ação dos macrófagos na adesão celular, sinalização, entrada de patógenos na célula (SCHUMANN et al., 2011).

Verificamos que o ácido vacênico diminuiu significativamente no grupo controle HFÁgua e que os tratamentos com Coa, Gos e COAG conseguiram aumentar esse ácido graxo na SM, ficando em concentrações até maiores do que nos indivíduos saudáveis, porém sem diferença significativa. Por ser um MUFA que possui instauração, o ácido vacênico pode interferir na ativação das balsas levando a instabilidade de receptores, como observado por SCHUMANN et al., (2011) que verificou que o aumento de PUFA levou a uma desestabilização das balsas lipídicas. Isso é consistente se analisarmos o que foi observado para o receptor TLR4, onde sua expressão não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, entretanto a concentração de IL-6 diminuiu em todos os tratamentos.

Como dito anteriormente, constatamos que o gênero *Mucispirillum* pode estar relacionado com o aumento do ácido vacênico no grupo HFGos e ainda pela análise de correlação, encontramos o táxon Mogibacteriaceae como grupo correlacionado positivamente com o ácido vacênico, e negativamente com o IL-6 no cólon. Mogibacteriaceae foi encontrado em grande abundância em todos os tratamentos e praticamente ausente no HFÁgua (figura 19). Dessa forma, presume-se que o táxon Mogibacteriaceae esteja produzindo ácido vacênico como produto do metabolismo do ácido linoleico, que por sua vez é incorporado na fração SM da membrana, podendo estar associada às balsas lipídicas, desestabilizando o receptor TLR4 e culminando com a menor produção do IL-6 através da diminuição de sua ativação.

NAKAZAWA et al., (2000) propuseram, através de comparações da sequência do gene 16S e análises das características fenotípicas, que o gênero *Mogibacterium* pertencente à família Mogibacteriaceae, possui homologias que se aproxima do gênero *Eubacterium*. A espécie *Eubacterium timidum* se aproxima tanto que inclusive os autores propõem que uma nova reclassificação seja feita. O gênero de *Eubacterium* são assacarolíticas, gram positivas, anaeróbicas, crescem

lentamente e existem nove espécies já bem estabelecidas que compõem a microbiota oral e que possuem essas características em comum: *E. timidum*, *E. brachy*, *E. nodatum*, *E. lentum*, *E. saphenum*, *E. minutum*, *E. exiguum* (reclassificada como *Slackia exigua*), *E. tardum* e *E. infirmum*.

As espécies de *Eubacterium* também são encontradas no trato intestinal e no ambiente. Um estudo quantitativo sobre a microbiota intestinal verificaram que a *Eubacterium* é o segundo gênero mais abundante no cólon (WADE, 2006).

EYSEN; VERHULST, (1984) encontraram em seu trabalho que todas as linhagens de *E. lentum* isoladas das fezes de ratos converteram o ácido linoleico em ácido vacênico pelo processo de biohidrogenação.

Todas essas informações nos levam a refletir sobre a possibilidade da *E. lentum* também fazer parte da família Mogibacteriaceae, assim como foi proposto para a espécie *Eubacterium timidum* o que reforçaria nossos resultados encontrados. Porém, mais estudos filogenéticos desses grupos necessitam ser feitos para confirmar essa hipótese.

Pela análise do *heatmap* (figura 19), observamos que alguns táxons se mostraram abundantes nos grupos Nágua e HFCOAG como YS2, S24-7, Rikenellaceae e Alphaproteobacteria e que não foram representativos nos demais grupos.

YS2 é reconhecido como membro do filo Cyanobacteria e análises genômicas dessa bactéria demonstrou que a mesma não possui atividade fotossintética sugerindo que ela seja classificada dentro de uma nova classe Melainabacteria. Análises metabólicas identificaram uma série de funções específicas como fermentação anaeróbica obrigatória, produção de H₂ sintrópica, fixação de nitrogênio e síntese de vitaminas B e K (ZENG et al., 2015). Além disso a abundância relativa da YS2 correlacionou-se positivamente com o aumento do ácido miristoleico (14:1n9) da classe SM, que assim como o ácido vacênico, teve um aumento significativo no grupo HFCOAG. Ambos, ácido vacênico e miristoleico são monoinsaturados, o que nos leva a deduzir que ocorre uma modulação principalmente dos MUFAs das balsas lipídicas pela dieta e tratamento com COAG.

Múltiplos estudos relatam a alteração na abundância do táxon S24-7 em associação às diferentes condições ambientais (SERINO et al., 2012; ROOKS et al., 2014; ORMEROD et al., 2016). Pesquisas com genes marcadores indicam que os membros desta família são altamente localizados no trato gastrointestinal de animais

homeotérmicos e estão sendo cada vez mais reconhecidos como um membro numericamente predominante da microbiota intestinal; entretanto, ainda pouco se sabe sobre a natureza de suas interações com o hospedeiro (ORMEROD et al., 2016). Em um estudo recente (EVANS et al., 2014) demonstraram que ratos sedentários com alto teor de gordura apresentaram menor nível de família S24-7. A presença de S24-7 no cólon foi associado à remissão de colite ulcerativa (ROOKS et al., 2014).

A família de bactérias S24-7, da ordem Bacteroidales tem sido associada ao diabetes autoimune. Constatou-se que S24-7 são mais abundantes no ceco de animais que apresentam diabetes tipo II em relação aos não diabéticos e sua abundância aumentou expressivamente quando esses animais foram alimentados com uma dieta hipercalórica suplementada com Gos (LAGKOUVARDOS et al., 2016). Esses resultados se aproximam com o que foi observado em nosso estudo, onde S24-7 apresentou uma maior abundância relativa no grupo HFCOAG, que é suplementado com Gos, porém não foi tão expressivo no grupo tratado exclusivamente com Gos (HFGos) o que nos leva a deduzir que o tratamento COAG potencializou a colonização desse táxon e que o mesmo suplemento (Gos) isolado ou associado afetam diretamente a composição dessas bactérias intestinais. S24-7 é capaz de produzir inúmeras vitaminas do complexo B, porém não possui a via para produção da B12 e ainda consegue lidar com o *stress* oxidativo, crescendo em ambientes microaeróbicos (ORMEROD et al., 2016).

O grupo da Alphaproteobacteria são de vida livre ou associadas ao hospedeiro, fixam nitrogênio, sendo quimioheterótrofos ou quimioautótrofos. Algumas Alphaproteobacteria exibem extensões exclusivas chamadas *prosthecae*, que são projeções filamentosas externas que aumenta sua razão superfície-volume. Ao fazer isso, as bactérias são capazes de viver em ambientes com poucos nutrientes (COLLIER, 2016).

Em estudos utilizando dietas isocalóricas suplementadas com ácidos graxos saturados e óleo de peixe, encontraram Alphaproteobacteria, juntamente com outros táxons como *Akkermansia muciniphila* e RF39, em maior abundância nos animais que receberam dieta suplementadas com PUFA's, que apresentaram uma menor adiposidade e inflamação (CAESAR et al., 2015). Alphaproteobacteria e RF39 estão presentes em grande abundância no grupo HFCOAG, que também apresentou uma menor adiposidade em relação a todos os tratamentos com dieta hiperlipídica,

sugerindo que esse tratamento proporcionou um aumento desses táxons mesmo em uma condição de indução da obesidade que foi positiva em controlar a adiposidade.

Algumas bactérias apresentaram abundância relativa no grupo HFágua que contraria o que foi observado em alguns trabalhos sobre microbiota, como o caso da Rikenellaceae, *Prevotella* e *Roseburia*.

O táxon Rikenellaceae foi praticamente ausente nesse grupo, porém apresentou alta abundância nos grupos Nágua e HFCOAG. KIM et al., (2012) encontrou um aumento de Rikenellaceae em animais submetidos à dieta hiperlipídica, que juntamente com o aumento de outros táxons como Enterobacteriaceae e Ruminococcaceae, observaram o desenvolvimento de inflamação no intestino, já que é o primeiro tecido exposto diretamente aos componentes da dieta.

Prevotella e *Roseburia* são considerados gêneros associados ao estado saudável no indivíduo, pois são produtoras de butirato (TREMAROLI; BÄCKHED, 2012; VITAL; HOWE; TIEDJE, 2014). O butirato é um AGCC produzido por essas bactérias que possui atividade antiobesogênica pois fornece fonte de energia para os colonócitos, aumenta a atividade mitocondrial, aumenta a sensibilidade à insulina, possui potencial anti-inflamatório e aumenta a função da barreira intestinal (CHAKRABORTI, 2015).

Todavia, *Prevotella* foi maior no grupo HFágua, seguido de HFCoa e HFGos e praticamente desaparece nos tratamentos Nágua e HFCOAG. *Roseburia* também apresentou-se maior no tratamento HFCoa, seguido do HFágua e HFGos e praticamente ausente no grupo HFCOAG e Nágua. Seria esperado uma elevada abundância desses táxons também nesses dois últimos grupos, porém isso não foi constatado. Aparentemente os tratamentos HFCoa e HFGos isoladamente foram melhores em favorecer a colonização dessas bactérias do que a associação dos tratamentos.

Alguns grupos de bactérias foram identificadas somente em um determinado grupo experimental, como o caso do gênero *Bilophila* no grupo HFGos e do táxon RF39 no grupo HFCOAG, fazendo com que essas bactérias constituam uma assinatura microbiana desses grupos.

O gênero *Bilophila* é descrita como assacarolítica, anaeróbica, gram-negativa, catalase positiva e possui como *habitat* natural o trato gastrointestinal, entretanto este gênero já foi encontrado em cavidades orais e vaginais (BARON et al., 1992).

Bilophila sp. foi identificada em inúmeras patologias como peritonite (BENNION et al., 1990b), apendicite (BENNION et al., 1990a), em abscessos de fígado (MOCHIDA et al., 1998) e empiema pleural (BARON et al., 1989) provavelmente por possuir catalase, conseguindo sobreviver nas células que invadem. Este gênero foi ainda encontrado em grande abundância em animais submetidos a dietas hiperlipídicas com grande concentração de AG saturados (CAESAR et al., 2015) e relacionados à incidência de colite (HUTTENHOWER et al., 2012).

Bilophila além de se mostrar um táxon exclusivo do HFGos, esta ainda apresentou correlação positiva com o IFN γ , o que explicaria as grandes concentrações dessa citocina, que foi maior em relação a todos os demais grupos estudados. O IFN γ é um ativador de células da imunidade adquirida promovendo a diferenciação de células CD4 para o subgrupo Th1 estando diretamente relacionado com infecções. O aumento do IFN γ observado nesse grupo pode ser devido à capacidade virulenta dessa bactéria, que é considerada a terceira bactéria anaeróbica isolada mais comum presente em gangrenas e apendicites (BENNION et al., 1990a). Apesar do gênero *Bilophila* ter sido encontrado em animais tratados com dietas obesogênicas, parece que de alguma forma o tratamento com Gos isoladamente influenciou a colonização táxon, porém entendimento dessa seletividade permanece ainda desconhecida.

Ao contrário do observado em *Bilophila*, o gênero *Turicibacter* apresentou correlação negativa com o IFN γ . Pela correlação negativa, a alta abundância de *Turicibacter* está diretamente relacionada a uma diminuição na concentração de IFN γ , e que faz sentido quando observamos a abundância desse táxon com a concentração dessa citocina nos diferentes grupos experimentais. *Turicibacter* apresentou alta abundância em HFágua e Nágua, grupos que apresentaram os menores valores de IFN γ e praticamente desapareceu no grupo HFGos que apresentou significativamente os maiores valores dessa citocina.

Existem poucos estudos descritivos sobre *Turicibacter* e sua interação com o hospedeiro. *Turicibacter sanguinis* foi isolado do sangue de humanos com apendicite aguda (BOSSHARD; ZBINDEN; ALTWEGG, 2002), das fezes de camundongos *germ free* infectados com microbiota majoritariamente gram-positivas (AUCHTUNG et al., 2016) e mais recentemente sua presença no intestino foi associada com o sistema imune e seu potencial em infectar linfócitos B e NK, porém mais estudos são necessários para confirmar se *Turicibacter* é um agente causativo nas respostas

imunológicas (PRESLEY et al., 2010). Todavia, a abundância relativa de *Turicibacter* também foi encontrada como sendo maior em animais alimentados com dieta hiperlipídica do que em animais suplementados com PUFA's (CAESAR et al., 2015) o que corrobora com nossos resultados.

RF39 pertencente ao filo Tenericuttis apresentou um grande aumento em sua abundância relativa em ratos tratados com teobromina, um alcaloide usado no tratamento para edema e problemas circulatórios como aterosclerose e hipertensão (MARTÍN-PELÁEZ et al., 2017). Esse táxon foi bastante representativo no grupo COAG o que faz dele uma assinatura microbiana exclusiva desse grupo. Percebe-se que a associação do COAG apresenta efeitos sinérgicos, que induz a proliferação desse grupo, pois RF39 não aparece nos demais grupos em que o Gos e Coa foram administrados isoladamente.

Um resultado interessante que também pode estar associado à diminuição das citocinas pró-inflamatórias observada no cólon foram as bactérias que apresentaram as maiores porcentagens de dissimilaridade entre os grupos HFágua e HFCOAG, como as Lachnospiraceae e as *Porphyromonas* (tabela 09). Essas bactérias apresentaram maior abundância relativa no grupo HFCOAG e são justamente aquelas citadas como produtoras de butirato (VITAL; HOWE; TIEDJE, 2014).

Bactérias que produzem butirato estão em sua grande maioria dentro do Filo Firmicutes, porém representantes de outros filos como Fusobacteria e Bacteroidetes costumam ser considerados como produtores de butirato em potencial no ambiente entérico (BARKER; KAHN; HEDRICK, 1982). No filo Firmicutes, membros da família Lachnospiraceae and Ruminococcaceae tem recebido bastante atenção por serem encontradas em abundância no cólon humano, perfazendo de 10 a 20% do total das bactérias do cólon (HAMER et al., 2008). Essas famílias estão fortemente associadas com a produção de butirato, um AGCC que possui papel fundamental na manutenção da homeostase e integridade do epitélio intestinal, uma vez que serve como principal fonte de energia para os enterócitos e interfere nos sinais pró-inflamatórios inibindo a via NF-kB (CLEMENTE et al., 2012). A quebra da barreira epitelial está associada com a origem das doenças inflamatórias intestinais e síndrome metabólica e a presença de bactérias produtoras de butirato normalmente conseguem controlar a inflamação (QIN et al., 2012).

Percebe-se em nosso estudo que as *Lachnospiraceae* e as *Porphyromonas* presentes no grupo HFCOAG são as bactérias que mais se distanciam do grupo HFÁgua, e que são potencialmente relacionadas com a produção de butirato, o que explicaria a diminuição das citocinas pró-inflamatórias observada no cólon desses animais, pela inibição da via do NF- κ B e de outros efeitos anti-inflamatórios do butirato como diminuição da enzima cicloxigenase-2, inibindo a sinalização do IFN- γ e regulando positivamente o receptor γ ativado por proliferador de peroxissomos (PPAR γ) (SCHWAB et al., 2007).

O gênero *Lactobacillus* apresentou 1,46% de dissimilaridade entre HFÁgua e HFCOAG, com abundância relativa maior no grupo HFCOAG. Apesar desse gênero não ser considerada produtora de butirato, ela está associada com estado saudável pela sua capacidade ampliada de controle de infecções por agentes patogênicos entéricos, associada ao controle da toxemia crônica natural. Tais bactérias são gram-positivas, heterofermentativos, produz quase exclusivamente ácido láctico a partir da via de degradação da glicose, embora também possa produzir acetaldeído, que também pode ser proveniente de compostos azotados (por exemplo treonina), uma vez que *Lactobacillus* exibe uma elevada síntese de treonina aldolase (DE VRIES et al., 2006). *Lactobacillus* não estão presentes em grandes quantidades no intestino humano sob circunstâncias normais, embora sua quantidade e tipos de espécies possam variar entre as diferentes populações (MACFARLANE; STEED; MACFARLANE, 2008). O aumento da abundância de *Lactobacillus* no trato gastrointestinal já foram associados com a administração de Gos por diversos autores (ITO et al., 1993; ALLES et al., 1999; MORO et al., 2002).

Nossas evidências experimentais mostraram que a dieta hiperlipídica associada aos tratamentos promovem uma modulação, que se inicia no intestino, a partir da colonização e/ou diminuição de grupos de bactérias, que por sua vez conseguem metabolizar e modular os lipídeos inseridos na membrana plasmática desse tecido, assim como influenciam diretamente no estado inflamatório que se inicia no intestino. Segundo LAGKOUVARDOS et al., (2016) a obesidade e outras doenças inflamatórias, representam estados de associação microbiota-hospedeiro estáveis alternativos e são, portanto, difíceis de curar. A dieta hiperlipídica desregula a homeostase e fornece condições de estados alternativos além dos limites de resiliência dos grupos de bactérias, que leva a um estado pré-doença, mais suscetível ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Acredita-se

que a microbiota e o hospedeiro mantenham o sistema em um estado estável, seja na saúde, pré-doença ou doença.

Estudos com o coacervado isoladamente já haviam sido conduzidos pelo nosso grupo de laboratório e tínhamos como *background* que o coacervado era benéfico em modular positivamente a inflamação, reduzindo massa corporal e diminuição dos lipídeos séricos e LPS (DE SOUZA et al., 2014; MORENO et al., 2014). Inúmeros estudos com Gos também foram conduzidos e que mostraram também seus efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (ALLIET et al., 2007; KUKKONEN et al., 2007; VAN HOFFEN et al., 2009; HOLMA et al., 2011). Entretanto, a associação do Coacervado e Gos demonstrou ser mais efetivo no tratamento contra a obesidade, uma vez que a associação microbiota-hospedeiro se mostrou mais próxima do grupo saudável, levando a um menor desequilíbrio da microbiota mesmo sob condições de uma dieta hiperlipídica, evidenciando que os compostos administrados atuam sinergicamente no intestino, oferecendo uma melhor resposta terapêutica e promovendo um estado estável entre a microbiota e o hospedeiro mais próximo da saúde do que da pré-doença.

É importante salientar que mais estudos ainda necessitam ser conduzidos para verificar os aspectos metabólicos em outros tecidos e tentar elucidar as atividades biológicas desses compostos no organismo como um todo.

7. CONCLUSÃO

Como conclusão, podemos pontuar os seguintes itens:

- As diferentes dietas influenciaram na diversidade e composição da microbiota intestinal.
- Dentre os tratamentos, a composição da microbiota do grupo HFCOAG ficou mais próxima do controle saudável demonstrando altas porcentagens de dissimilaridade para bactérias representantes do estado saudável como as *Lachnospiraceae* e *Porphyromonas* e apresentou o táxon RF39 como assinatura microbiana.
- Os grupos HFCoa e HFCOAG demonstraram manter o mesmo ganho de massa corpórea que o controle saudável e somente o HFCOAG apresentou diminuição da adiposidade e eficiência energética comparado ao controle hiperlipídico.
- Todos os tratamentos apresentaram uma diminuição das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β no ceco e IL-6 cólon sendo que o HFCoa apresentou uma melhor atividade anti-inflamatória no ceco (IL-10/TNF α).
- O grupo HFGos apresentou altas concentrações de IFN γ e o gênero *Bilophila* como assinatura bacteriana que foi correlacionado com esse incremento observado de IFN γ .
- Todos os tratamentos aumentaram a concentração de ácido vacênico (18:1n7) na classe SM da membrana do cólon e isso pode estar relacionado com a instabilidade das balsas lipídicas que ativam os receptores TLR4, uma vez que foi constatado diminuição do IL-6 nesse tecido.
- O tratamento HFCOAG aumentou as concentrações do ácido vacênico e ácido miristoleico (14:1n9) na classe SM demonstrando correlações desses ácidos graxos associados a uma melhor atividade anti-inflamatória no cólon. O aumento observado do ácido vacênico foi correlacionado ao táxon *Mogibacteriaceae*.
- O tratamento HFGos aumentou o ácido palmitoleico (16:1n7) na classe PC, que se correlacionou negativamente com a atividade anti-inflamatória no cólon.

De uma forma geral, ficou claro que a dieta influencia diretamente no perfil da microbiota intestinal durante a obesidade e consequentemente nas respostas metabólicas associadas. A associação COAG demonstrou ser a melhor resposta preventiva diante das mudanças típicas da obesidade, apresentando, dentre todos os tratamentos, uma microbiota mais próxima do saudável, assim como maior mobilização de ácidos graxos conjugados do ácido linoleico (CLA) para as membranas do cólon e melhora na atividade inflamatória. Todavia mais estudos são necessários para avaliar outros aspectos metabólicos nos diferentes tecidos e no desenvolvimento desse composto que poderá ser utilizado futuramente como um profilático contra a obesidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUBAKAR, a; SAITO, T.; KITAZAWA, H.; KAWAI, Y.; ITOH, T. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. **Journal of dairy science**, v. 81, n. 12, p. 3131–3138, 1998.

ALLES, M. S.; HARTEMINK, R.; MEYBOOM, S.; HARRYVAN, J. L.; VAN LAERE, K. M. J.; NAGENGAST, F. M.; HAUTVAST, J. G. A. J. Effect of transgalactooligosaccharides on the composition of the human intestinal microflora and on putative risk markers for colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 5, p. 980–991, 1999.

ALLIET, P.; SCHOLTENS, P.; RAES, M.; HENSEN, K.; JONGEN, H.; RUMMENS, J. L.; BOEHM, G.; VANDENPLAS, Y. Effect of prebiotic galacto-oligosaccharide, long-chain fructo-oligosaccharide infant formula on serum cholesterol and triacylglycerol levels. **Nutrition**, v. 23, n. 10, p. 719–723, 2007.

ANDERSON, Marti J.; WALSH, Daniel CI. PERMANOVA, ANOSIM, and the Mantel test in the face of heterogeneous dispersions: what null hypothesis are you testing?. **Ecological monographs**, v. 83, n. 4, p. 557-574, 2013.

ANDRIGHETTI, T. **Ferramenta computacional para identificação de micro-organismos com base em assinaturas genômicas**. 2015. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”, 2015.

AUCHTUNG, T. A.; HOLDER, M. E.; GESELL, J. R.; AJAMI, N. J.; DUARTE, R. T. D.; ITOH, K.; CASPI, R. R.; PETROSINO, J. F.; HORAI, R.; ZÁRATE-BLADÉS, C. R. Complete Genome Sequence of *Turicibacter* sp. Strain H121, Isolated from the Feces of a Contaminated Germ-Free Mouse. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, p. e00114-16, 2016. Disponível em: <<http://genomea.asm.org/lookup/doi/10.1128/genomeA.00114-16>>.

BARON, E. J.; CURREN, M.; HENDERSON, G.; JOUSIMIES-SOMER, H.; LEE, K.; LECHOWITZ, K.; STRONG, C. A.; SUMMANEN, P.; TUNER, K.; FINEGOLD, S. M. *Bilophila wadsworthia* isolates from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1882–1884, 1992.

BARON, E. J.; SUMMANEN, P.; DOWNES, J.; ROBERTS, M. C.; WEXLER, H.; FINEGOLD, S. M. *Bilophila wudsworthiu*, gen. nov. and sp. nov., a Unique Gram-negative Anaerobic Rod Recovered from Appendicitis Specimens and Human Faeces. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 3405–3411, 1989.

BENNION, R. S.; BARON, E. J.; THOMPSON, J. E.; DOWNES, J.; SUMMANEN, P.; TALAN, D. A.; FINEGOLD, S. M. The bacteriology of gangrenous and perforated appendicitis - Revisited. **Annals of Surgery**, v. 211, n. 2, p. 165–171, 1990a.

BENNION, R.; THOMPSON, J.; BARON, E.; SM, F. Gangrenous and perforated appendicitis with peritonitis: treatment and bacteriology. **Clinical Therapeutics**, v. 12, p. 31–44, 1990b. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/2202510>>.

BOLGER, Anthony M.; LOHSE, Marc; USADEL, Bjoern. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BOSSHARD, P. P.; ZBINDEN, R.; ALTWEGG, M. novel anaerobic , Gram-positive bacterium. v. 12, n. 2002, p. 1263–1266, 2002.

BICAS, J. L.; SILVA, J. C.; DIONÍSIO, A. P.; PASTORE, G. M. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 7–18, 2010.

BRESLIN, J. W.; WU, M. H.; GUO, M.; REYNOSO, R.; YUAN, S. Y. Toll-Like Receptor 4 Contributes To Microvascular Inflammation and Barrier Dysfunction in Thermal Injury. **Shock**, v. 29, n. 3, p. 1, 2007. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00024382-9000000000-99841>>.

BRETSCHER, M. S. Phosphatidyl-ethanolamine: Differential labelling in intact cells and cell ghosts of human erythrocytes by a membrane-impermeable reagent. **Journal of Molecular Biology**, v. 71, n. 3, p. 523–528, 1972.

BRETSCHER, M. S. The molecules of the cell membrane. **Scientific american**, v. 253, n. 4, p. 11–109, 1973. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stabel/24967813>>. BROWN, D. A.; ROSE, J. K. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. **Cell**, v. 68, n. 3, p. 533–544, 1992.

BRUN, P.; CASTAGLIUOLO, I.; LEO, V. Di; BUDA, A.; PINZANI, M.; PALU, G.; MARTINES, D. Increased intestinal permeability in obese mice : new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. p. 518–525, 2007.

BUETTNER, R.; PARHOFER, K. G.; WOENCKHAUS, M.; WREDE, C. E.; KUNZ-SCHUGHART, L. A.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. Defining high-fat-diet rat models: Metabolic and molecular effects of different fat types. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 36, n. 3, p. 485–501, 2006.

CAESAR, R.; TREMAROLI, V.; KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; CANI, P. D.; BÄCKHED, F. Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 4, p. 658–668, 2015.

CANI, P. D.; DELZENNE, N. M. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 10, n. 6, p. 729–734, 2007.

CAPORASO, J. Gregory et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME journal**, v. 6, n. 8, p. 1621, 2012.

CAPORASO, J. Gregory et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335, 2010.

CHAKRABORTI, C. K. New-found link between microbiota and obesity. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 6, n. 4, p. 110, 2015. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/2150-5330/full/v6/i4/110.htm>>.

CHRISTIE, William W. **Gas chromatography and lipids**. Oily, 1989.

CLANDININ, M. T.; CHEEMA, S.; FIELD, C. J.; GARG, M. L.; VENKATRAMAN, J.; CLANDININ, T. R. Dietary and fat: cell exogenous function determination. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 13, p. 2761–2769, 1991.

CLANDININ, M. T.; FIELD, C. J.; HARGREAVES, K.; MORSON, L.; ZSIGMOND, E. Role of diet fat in subcellular structure and function. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n. 5, p. 546–556, 1985. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/y85-094>>.

CLARKE, S. F.; MURPHY, E. F.; NILAWEERA, K.; ROSS, P. R.; SHANAHAN, F.; COTTER, P. W.; COTTER, P. D. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: New insights. **Gut Microbes**, v. 3, n. 3, p. 1–17, 2012.

CLARRIDGE, J. E.; ALERTS, C. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, n. 4, p. 840–862, 2004.

CHAKRABORTI, C. K. New-found link between microbiota and obesity. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 6, n. 4, p. 110, 2015. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/2150-5330/full/v6/i4/110.htm>>.

COLLIER, J. Cell cycle control in Alphaproteobacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 30, p. 107–113, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2016.01.010>>.

DAVID, L. A.; MAURICE, C. F.; CARMODY, R. N.; GOOTENBERG, D. B.; BUTTON, J. E.; WOLFE, B. E.; LING, A. V.; DEVLIN, A. S.; VARMA, Y.; FISCHBACH, M. A.; BIDDINGER, S. B.; DUTTON, R. J.; TURNBAUGH, P. J. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 559–563, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature12820>>.

DA SILVA, A. S. R.; PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; OLIVEIRA, A. G.; CINTRA, D. E.; DE SOUZA, C. T.; VELLOSO, L. A.; CARVALHEIRA, J. B. C.; SAAD, M. J. A. Exercise intensity, inflammatory signaling, and insulin resistance in obese rats. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 12, p. 2180–2188, 2010.

DE SOUZA, G. I. D. M. H.; SANTAMARINA, A. B.; SANTANA, A. A. De; LIRA, F. S.; LAQUILA, R. De; MORENO, M. F.; RIBEIRO, E. B.; NASCIMENTO, C. M. D. P. O. Do; RODRIGUES, B.; ESPOSITO, E.; OYAMA, L. M. Preventive effects of chitosan coacervate whey protein on body composition and immunometabolic aspect in Obese Mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

DE VRIES, M. C.; VAUGHAN, E. E.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W. M. Lactobacillus plantarum-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1018–1028, 2006.

DECSI, T.; CSABI, G.; TOROK, K.; ERHARDT, E.; MINDA, H.; BURUS, I.; MOLNAR, S.; MOLNAR, D. Polyunsaturated fatty acids in plasma lipids of obese children with and without metabolic cardiovascular syndrome. **Lipids**, v. 35, n. 11, p. 1179–1184, 2000.

DESANTIS, Todd Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069-5072, 2006.

DEVILLARD, E.; MCINTOSH, F. M.; DUNCAN, S. H.; WALLACE, R. J. Metabolism of linoleic acid by human gut bacteria: Different routes for biosynthesis of conjugated linoleic acid. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 6, p. 2566–2570, 2007.

DOBRIAN, A. D.; DAVIES, M. J.; PREWITT, R. L.; LAUTERIO, T. J. Development of Hypertension in a Rat Model of Diet-Induced Obesity. **Hypertension**, v. 35, n. 4, p. 1009–1015, 2000. Disponível em: <<http://hyper.ahajournals.org/content/35/4/1009.abstract>>.

DRANCOURT, M.; BERGER, P.; RAOULT, D. Systematic 16S rRNA Gene Sequencing of Atypical Clinical Isolates Identified 27 New Bacterial Species Associated with Humans. **Society**, v. 42, n. 5, p. 2197–2202, 2004.

DUCA, F. A.; SAKAR, Y.; LEPAGE, P.; DEVIME, F.; LANGELIER, B.; DORÉ, J.; COVASA, M. Replication of obesity and associated signaling pathways through transfer of microbiota from obese-prone rats. **Diabetes**, v. 63, n. 5, p. 1624–1636, 2014.

DUNCAN, S. H.; LOBLEY, G. E.; HOLTROP, G.; INCE, J.; JOHNSTONE, A. M.; LOUIS, P.; FLINT, H. J. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. **International Journal of Obesity**, v. 32, n. 11, p. 1720–1724, 2008.

EDGAR, Robert C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010.

EPAND, R. M. Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes**, v. 1376, n. 3, p. 353–368, 1998.

FIELDING, P. E.; FIELDING, C. J. CHAPTER 21 Lipoprotein receptors. **New Comprehensive Biochemistry**, v. 36, p. 527–552, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167730602360228>>.

EVANS, C. C.; LEPARD, K. J.; KWAK, J. W.; STANCUKAS, M. C.; LASKOWSKI, S.; DOUGHERTY, J.; MOULTON, L.; GLAWE, A.; WANG, Y.; LEONE, V.; ANTONOPOULOS, D. A.; SMITH, D.; CHANG, E. B.; CIANCIO, M. J. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

EYSEN, H.; VERHULST, A. Biotransformation of linoleic acid and bile acids by *Eubacterium lentum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 39–43, 1984.

FOLCH, Jordi et al. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FOSTER, L. J.; DE HOOG, C. L.; MANN, M. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 10, p. 5813–5818, 2003. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0631608100>>.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A.; SALMINEN, S. J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K. S.; CANI, P. D.; VERBEKE, K.; REID, G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. **Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics**, 1994. Disponível em: <<http://queconceito.com.br/aptdao%5Cnhttp://conceito.de/comunicacao>>.

GOYAL, M. S.; VENKATESH, S.; MILBRANDT, J.; GORDON, J. I.; RAICHLE, M. E. Feeding the brain and nurturing the mind: Linking nutrition and the gut microbiota to brain development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 46, p. 14105–14112, 2015. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1511465112>>.

GURTOVENKO, A. A.; ANWAR, J. Interaction of ethanol with biological membranes: The formation of non-bilayer structures within the membrane interior and their significance. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 7, p. 1983–1992, 2009.

HAAS, Brian J. et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. **Genome research**, v. 21, n. 3, p. 494-504, 2011.

HABIB, N. C.; HONORÉ, S. M.; GENTA, S. B.; SÁNCHEZ, S. S. Hypolipidemic effect of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots on diabetic rats: Biochemical approach. **Chemico-Biological Interactions**, v. 194, n. 1, p. 31–39, 2011.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 195–195, 2005.

HANSEN, G. H.; IMMERDAL, L.; THORSEN, E.; NIELS-CHRISTIANSEN, L. L.; NYSTRØM, B. T.; DEMANT, E. J. F.; DANIELSEN, E. M. Lipid Rafts Exist as Stable Cholesterol-independent Microdomains in the Brush Border Membrane of Enterocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 34, p. 32338–32344, 2001.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 163–169, 2007.

HOLMA, R.; KEKKONEN, R. A.; HATAKKA, K.; POUSSA, T.; VAARALA, O.; ADLERCREUTZ, H.; KORPELA, R. Consumption of Galactooligosaccharides together with Probiotics Stimulates the In Vitro Peripheral Blood Mononuclear Cell Proliferation and IFN γ Production in Healthy Men. v. 2011, 2011.

HONTECILLAS, R.; WANNEMEULHER, M. J.; ZIMMERMAN, D. R.; HUTTO, D. L.; WILSON, J. H.; AHN, D. U.; BASSAGANYA-RIERA, J. Nutritional regulation of porcine bacterial-induced colitis by conjugated linoleic acid. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 7, p. 2019–2027, 2002.

HOTAMISLIGIL, G. S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A.; ELLIS, R.; WHITE, M. F.; SPIEGELMAN, B. M. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 271, n. 5249, p. 665–8, 1996.

HOWARD, F. A.; HENDERSON, C. Hydrogenation of polyunsaturated fatty acids by human colonic bacteria. **Lett Appl Microbiol**, v. 29, n. 3, p. 193–196, 1999.

HUTTENHOWER, C.; GEVERS, D.; KNIGHT, R.; ABUBUCKER, S.; BADGER, J. H.; CHINWALLA, A. T.; CREASY, H. H.; EARL, A. M.; FITZGERALD, M. G.; FULTON, R. S.; GIGLIO, M. G.; HALLSWORTH-PEPIN, K.; LOBOS, E. A.; MADUPU, R.; MAGRINI, V.; MARTIN, J. C.; MITREVA, M.; MUZNY, D. M.; SODERGREN, E. J.; VERSALOVIC, J.; WOLLAM, A. M.; WORLEY, K. C.; WORTMAN, J. R.; YOUNG, S. K.; ZENG, Q.; AAGAARD, K. M.; ABOLUDE, O. O.; ALLEN-VERCOE, E.; ALM, E. J.; ALVARADO, L.; ANDERSEN, G. L.; ANDERSON, S.; APPELBAUM, E.; ARACHCHI, H. M.; ARMITAGE, G.; ARZE, C. A.; AYVAZ, T.; BAKER, C. C.; BEGG, L.; BELACHEW, T.; BHONAGIRI, V.; BIHAN, M.; BLASER, M. J.; BLOOM, T.; BONAZZI, V.; PAUL BROOKS, J.; BUCK, G. A.; BUHAY, C. J.; BUSAM, D. A.; CAMPBELL, J. L.; CANON, S. R.; CANTAREL, B. L.; CHAIN, P. S. G.; CHEN, I. M. A.; CHEN, L.; CHHIBBA, S.; CHU, K.; CIULLA, D. M.; CLEMENTE, J. C.; CLIFTON, S. W.; CONLAN, S.; CRABTREE, J.; CUTTING, M. A.; DAVIDOVICS, N. J.; DAVIS, C. C.; DESANTIS, T. Z.; DEAL, C.; DELEHAUNTY, K. D.; DEWHIRST, F. E.; DEYCH, E.; DING, Y.; DOOLING, D. J.; DUGAN, S. P.; MICHAEL DUNNE, W.; SCOTT DURKIN, A.; EDGAR, R. C.; ERLICH, R. L.; FARMER, C. N.; FARRELL, R. M.; FAUST, K.; FELDGARDEN, M.; FELIX, V. M.; FISHER, S.; FODOR, A. A.; FORNEY, L. J.; FOSTER, L.; DI FRANCESCO, V.; FRIEDMAN, J.; FRIEDRICH, D. C.; FRONICK, C. C.; FULTON, L. L.; GAO, H.; GARCIA, N.; GIANNOUKOS, G.; GIBLIN, C.; GIOVANNI, M. Y.; GOLDBERG, J. M.; GOLL, J.; GONZALEZ, A.; GRIGGS, A.; GUJJA, S.; KINDER HAAKE, S.; HAAS, B. J.; HAMILTON, H. A.; HARRIS, E. L.; HEPBURN, T. A.; HERTER, B.; HOFFMANN, D. E.; HOLDER, M. E.; HOWARTH, C.; HUANG, K. H.; HUSE, S. M.; IZARD, J.; JANSSON, J. K.; JIANG, H.; JORDAN, C.; JOSHI, V.; KATANCIK, J. A.; KEITEL, W. A.; KELLEY, S. T.; KELLS, C.; KING, N. B.; KNIGHTS, D.; KONG, H. H.; KOREN, O.; KOREN, S.; KOTA, K. C.; KOVAR, C. L.; KYRPIDES, N. C.; LA ROSA, P. S.; LEE, S. L.; LEMON, K. P.; LENNON, N.; LEWIS, C. M.; LEWIS, L.; LEY, R. E.; LI, K.; LIOLIOS, K.; LIU,

B.; LIU, Y.; LO, C. C.; LOZUPONE, C. A.; DWAYNE LUNSFORD, R.; MADDEN, T.; MAHURKAR, A. A.; MANNON, P. J.; MARDIS, E. R.; MARKOWITZ, V. M.; MAVROMATIS, K.; MCCORRISON, J. M.; MCDONALD, D.; MCEWEN, J.; MCGUIRE, A. L.; MCINNES, P.; MEHTA, T.; MIHINDUKULASURIYA, K. A.; MILLER, J. R.; MINX, P. J.; NEWSHAM, I.; NUSBAUM, C.; OGLAUGHLIN, M.; ORVIS, J.; PAGANI, I.; PALANIAPPAN, K.; PATEL, S. M.; PEARSON, M.; PETERSON, J.; PODAR, M.; POHL, C.; POLLARD, K. S.; POP, M.; PRIEST, M. E.; PROCTOR, L. M.; QIN, X.; RAES, J.; RAVEL, J.; REID, J. G.; RHO, M.; RHODES, R.; RIEHLE, K. P.; RIVERA, M. C.; RODRIGUEZ-MUELLER, B.; ROGERS, Y. H.; ROSS, M. C.; RUSS, C.; SANKA, R. K.; SANKAR, P.; FAH SATHIRAPONGSASUTI, J.; SCHLOSS, J. A.; SCHLOSS, P. D.; SCHMIDT, T. M.; SCHOLZ, M.; SCHRIML, L.; SCHUBERT, A. M.; SEGATA, N.; SEGRE, J. A.; SHANNON, W. D.; SHARP, R. R.; SHARPTON, T. J.; SHENOY, N.; SHETH, N. U.; SIMONE, G. A.; SINGH, I.; SMILLIE, C. S.; SOBEL, J. D.; SOMMER, D. D.; SPICER, P.; SUTTON, G. G.; SYKES, S. M.; TABBAA, D. G.; THIAGARAJAN, M.; TOMLINSON, C. M.; TORRALBA, M.; TREANGEN, T. J.; TRUTY, R. M.; VISHNIVETSKAYA, T. A.; WALKER, J.; WANG, L.; WANG, Z.; WARD, D. V.; WARREN, W.; WATSON, M. A.; WELLINGTON, C.; WETTERSTRAND, K. A.; WHITE, J. R.; WILCZEK-BONEY, K.; WU, Y.; WYLIE, K. M.; WYLIE, T.; YANDAVA, C.; YE, L.; YE, Y.; YOOSEPH, S.; YOUNG, B. P.; ZHANG, L.; ZHOU, Y.; ZHU, Y.; ZOLOTH, L.; ZUCKER, J. D.; BIRREN, B. W.; GIBBS, R. A.; HIGHLANDER, S. K.; METHÉ, B. A.; NELSON, K. E.; PETROSINO, J. F.; WEINSTOCK, G. M.; WILSON, R. K.; WHITE, O. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207–214, 2012.

ITO, M.; DEGUCHI, Y.; MATSUMOTO, K.; KIMURA, M.; ONODERA, N.; YAJIMA, T. Note Influence of Galactooligosaccharides on the Human Fecal Microflora. **J. Nutr. Sci. Vitaminol**, v. 39, p. 635–640, 1993.

KIM, K. A.; GU, W.; LEE, I. A.; JOH, E. H.; KIM, D. H. High Fat Diet-Induced Gut Microbiota Exacerbates Inflammation and Obesity in Mice via the TLR4 Signaling Pathway. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

KONIG, D.; BERG, A.; WEINSTOCK, C.; KEUL, J.; NORTHOFF, H. Essential fatty acids, immune function, and exercise. **Exercise Immunology Review**, v. 3, p. 1–31, 1997.

KUKKONEN, K.; SAVILAHTI, E.; HAAHTELA, T.; JUNTUNEN-BACKMAN, K.; KORPELA, R.; POUSSA, T.; TUURE, T.; KUITUNEN, M. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 1, p. 192–198, 2007.

KWAK, N. S.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: The development of a regulatory concept. **Food Control**, v. 12, n. 2, p. 99–107, 2001.

LAGKOUVARDOS, I.; PUKALL, R.; ABT, B.; FOESEL, B. U.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; KUMAR, N.; BRESCIANI, A.; MARTÍNEZ, I.; JUST, S.; ZIEGLER, C.; BRUGIROUX, S.; GARZETTI, D.; WENNING, M.; BUI, T. P. N.; WANG, J.; HUGENHOLTZ, F.; PLUGGE, C. M.; PETERSON, D. A.; HORNEF, M. W.; BAINES,

J. F.; SMIDT, H.; WALTER, J.; KRISTIANSEN, K.; NIELSEN, H. B.; HALLER, D.; OVERMANN, J.; STECHER, B.; CLAVEL, T. The Mouse Intestinal Bacterial Collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 10, p. 1–15, 2016.

LEY, R. E.; BACKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. D.; GORDON, J. I. Obesity alters gut microbial ecology. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 31, p. 11070–11075, 2005.

LIN, S.; THOMAS, T. C.; STORLIEN, L. H.; HUANG, X. F. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. **International Journal of Obesity**, v. 24, n. 5, p. 639–646, 2000.

LINGWOOD, D.; KAISER, H.-J.; LEVENTAL, I.; SIMONS, K. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, n. 5, p. 955–960, 2009.

LOZUPONE, Catherine; KNIGHT, Rob. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228-8235, 2005.

MACFARLANE, G. T.; STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 305–344, 2008.

MARTÍN-PELÁEZ, S.; CAMPS-BOSSACOMA, M.; MASSOT-CLADERA, M.; RIGO-ADROVER, M.; FRANCH, À.; PÉREZ-CANO, F. J.; CASTELL, M. Effect of cocoa's theobromine on intestinal microbiota of rats. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 61, n. 10, p. 1–31, 2017.

MATTOS, P. De; ANDRADE, M. Ácidos Graxos N-3 : Um Link Entre Eicosanóides , Inflamação E Imunidade. **MN-Metabólica**, v. 8, n. 3, p. 135–143, 2006.

MERRILL, A. H.; STEVENS, V. L. Modulation of protein kinase C and diverse cell functions by sphingosine - a pharmacologically interesting compound linking sphingolipids and signal transduction. **BBA - Molecular Cell Research**, v. 1010, n. 2, p. 131–139, 1989.

MICHEL, V.; BAKOVIC, M. Lipid rafts in health and disease. **Biology of the Cell**, v. 99, n. 3, p. 129–140, 2007.

MILLS, E. N. C.; ALCOCER, M. J. C.; MORGAN, M. R. A. Biochemical interactions of food-derived peptides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 3, n. C, p. 64–68, 1992.

MOCHIDA, C.; HIRAKATA, Y.; MATSUDA, J.; IORI, F.; OZAKI, Y.; NAKANO, M.; HAMAGUCHI, K.; IZUMIKAWA, K.; YAMAGUCHI, T.; TOMONO, K.; MAESAKI, S.; YAMADA, Y.; KOHNO, S.; KAMIHIRA, S. Antimicrobial susceptibility testing of *Bilophila wadsworthia* isolates submitted for routine laboratory examination. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1790–1792, 1998.

MONTEIRO, R.; AZEVEDO, I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, n. Atp lii, 2010.

MORENO, M. F.; DE SOUZA, G. I. D. M. H.; HACHUL, A. C. L.; DOS SANTOS, B.; OKUDA, M. H.; NETO, N. I. P.; BOLDARINE, V. T.; ESPOSITO, E.; RIBEIRO, E. B.; DO NASCIMENTO, C. M. D. P. O.; GANEN, A. D. P.; OYAMA, L. M. Coacervate whey protein improves inflammatory milieu in mice fed with high-fat diet. **Nutrition & metabolism**, v. 11, p. 15, 2014.

MORO, G.; MINOLI, I.; MOSCA, M.; FANARO, S.; JELINEK, J.; STAHL, B.; BOEHM, G. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 34, n. 3, p. 291–295, 2002.

NAGPAL, R.; BEHARE, P.; RANA, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M.; ARORA, S.; MOROTTA, F.; JAIN, S.; YADAV, H. Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. **Food Funct.**, v. 2, n. 1, p. 18–27, 2011.

NAKAZAWA, F.; SATO, M.; POCO, S. E.; HASHIMURA, T.; IKEDA, T.; KALFAS, S. Description of *Mogibacterium pumilum* gen. nov., sp. nov. and *Mogibacterium vescum* gen. nov., sp. nov., and reclassification of *Eubacterium timidum* (Holdeman et al. 1980) as *Mogibacterium timidum* gen. nov., comb. nov. p. 679–688, 2000.

NEPELSKA, M.; CULTRONE, A.; BÉGUET-CRESPEL, F.; LE ROUX, K.; DORÉ, J.; ARULAMPALAM, V.; BLOTTIÈRE, H. M. Butyrate Produced by Commensal Bacteria Potentiates Phorbol Esters Induced AP-1 Response in Human Intestinal Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. 1–10, 2012.

NEYRINCK, A. M.; POSSEMIERS, S.; DRUART, C.; VAN DE WIELE, T.; DE BACKER, F.; CANI, P. D.; LARONDELLE, Y.; DELZENNE, N. M. Prebiotic effects of wheat Arabinoxylan related to the increase in bifidobacteria, roseburia and bacteroides/prevotella in diet-induced obese mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.

NIKOLAKI, S.; TSIAMIS, G. Microbial diversity in the era of omic technologies. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

OHVO-REKILÄ, H.; RAMSTEDT, B.; LEPPIMÄKI, P.; PETER SLOTT, J. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. **Progress in Lipid Research**, v. 41, n. 1, p. 66–97, 2002.

OKSANEN, Jari et al. The vegan package. **Community ecology package**, v. 10, p. 631–637, 2007.

ORMEROD, K. L.; WOOD, D. L. A.; LACHNER, N.; GELLATLY, S. L.; DALY, J. N.; PARSONS, J. D.; DAL'MOLIN, C. G. O.; PALFREYMAN, R. W.; NIELSEN, L. K.; COOPER, M. A.; MORRISON, M.; HANSBRO, P. M.; HUGENHOLTZ, P. Genomic characterization of the uncultured Bacteroidales family S24-7 inhabiting the guts of

homeothermic animals. **Microbiome**, v. 4, p. 1–17, 2016.

PACHECO, M. T. B.; DIAS, N. F. G.; BALDINI, V. L. S.; TANIKAWA, C.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de hidrolisados obtidos a partir de concentrados protéicos de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, 2005.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1–16, 2010.

PETRIZ, B. A.; CASTRO, A. P.; ALMEIDA, J. A.; GOMES, C. P. C.; FERNANDES, G. R.; KRUGER, R. H.; PEREIRA, R. W.; FRANCO, O. L. Exercise induction of gut microbiota modifications in obese, non-obese and hypertensive rats. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2014.

PRESLEY, L. L.; WEI, B.; BRAUN, J.; BORNEMAN, J. Bacteria associated with immunoregulatory cells in mice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 3, p. 936–941, 2010.

PRICE, Morgan N.; DEHAL, Paramvir S.; ARKIN, Adam P. FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9490, 2010.

QIN, J.; LI, Y.; CAI, Z.; LI, S.; ZHU, J.; ZHANG, F.; LIANG, S.; ZHANG, W.; GUAN, Y.; SHEN, D.; PENG, Y.; ZHANG, D.; JIE, Z.; WU, W.; QIN, Y.; XUE, W.; LI, J.; HAN, L.; LU, D.; WU, P.; DAI, Y.; SUN, X.; LI, Z.; TANG, A.; ZHONG, S.; LI, X.; CHEN, W.; XU, R.; WANG, M.; FENG, Q.; GONG, M.; YU, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, M.; HANSEN, T.; SANCHEZ, G.; RAES, J.; FALONY, G.; OKUDA, S.; ALMEIDA, M.; LECHATLIER, E.; RENAULT, P.; PONS, N.; BATTO, J.-M.; ZHANG, Z.; CHEN, H.; YANG, R.; ZHENG, W.; LI, S.; YANG, H.; WANG, J.; EHRLICH, S. D.; NIELSEN, R.; PEDERSEN, O.; KRISTIANSEN, K.; WANG, J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 55–60, 2012.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–51, nov. 1993.

RÍOS-COVIÁN, D.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C. G.; SALAZAR, N. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–9, 2016.

RIVIÈRE, A.; SELAK, M.; LANTIN, D.; LEROY, F.; DE VUYST, L. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, 2016.

ROOKS, M. G.; VEIGA, P.; WARDWELL-SCOTT, L. H.; TICKLE, T.; SEGATA, N.; MICHAUD, M.; GALLINI, C. A.; BEAL, C.; VAN HYLCKAMA-VLIEG, J. E. T.;

BALLAL, S. A.; MORGAN, X. C.; GLICKMAN, J. N.; GEVERS, D.; HUTTENHOWER, C.; GARRETT, W. S. Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission. **ISME Journal**, v. 8, n. 7, p. 1403–1417, 2014.

ROSSI, O.; VAN BERKEL, L. A.; CHAIN, F.; TANWEER KHAN, M.; TAVERNE, N.; SOKOL, H.; DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J.; HARMSSEN, H. J. M.; LANGELLA, P.; SAMSOM, J. N.; WELLS, J. M. Faecalibacterium prausnitzii A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–12, 2016.

ROTHMAN, J.; LENARD, J. Membrane asymmetry. **Science**, v. 195, n. 4280, p. 743–753, 1977.

ROUFIK, S.; GAUTHIER, S. F.; TURGEON, S. L. In vitro digestibility of bioactive peptides derived from bovine α -lactoglobulin. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 4, p. 294–302, 2006.

SAITO, T.; NAKAMURA, T.; KITAZAWA, H.; KAWAI, Y.; ITOH, T. Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 7, p. 1434–1440, 2000.

SANCHES, C. S. Mecanismos de Interiorização - Dos Custos Ambientais na Indústria: Rumo a Mudanças de Comportamento. **RAE - Revista de Administração de Empresas**, v. 37, n. 2, p. 56–67, 1997.

SCHUMANN, J.; LEICHTLE, A.; THIERY, J.; FUHRMANN, H. Fatty acid and peptide profiles in plasma membrane and membrane rafts of PUFA supplemented RAW264.7 macrophages. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. 1–8, 2011.

SCHWAB, M.; REYNDERS, V.; LOITSCH, S.; STEINHILBER, D.; STEIN, J.; SCHRÖDER, O. Involvement of different nuclear hormone receptors in butyrate-mediated inhibition of inducible NF κ B signalling. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 15, p. 3625–3632, 2007.

SERINO, M.; LUCHE, E.; GRES, S.; BAYLAC, A.; BERGÉ, M.; CENAC, C.; WAGET, A.; KLOPP, P.; IACOVONI, J.; KLOPP, C.; MARIETTE, J.; BOUCHEZ, O.; LLUCH, J.; OUARNÉ, F.; MONSAN, P.; VALET, P.; ROQUES, C.; AMAR, J.; BOULOUMIÉ, A.; THÉODOROU, V.; BURCELIN, R. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. **Gut**, v. 61, n. 4, p. 543–553, 2012.

SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**, v. 387, n. 6633, p. 569–572, 1997.

SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 1, p. 31–39, 2000.

SIMONS, K.; VAN MEER, G. Lipid Sorting in Epithelial Cells. **Biochemistry**, v. 27, n. 17, p. 6197–6202, 1988.

SOUZA, G. I. de M. H. de. Investiga  o De Um Novo Alimento Funcional, Coacervado a Base De Prote  nas Do Soro De Queijo E Quitosana, Na Modula  o Do Tecido Adiposo Mesent  rico Em Camundongos. p. 110, 2013.

SUN, J.; CHANG, E. B. Exploring gut microbes in human health and disease: Pushing the envelope. **Genes and Diseases**, v. 1, n. 2, p. 132–139, 2014.

TOMAL, A. A. B.; CUNHA, M. E. .; BOSSO, A.; YOUSSEF, E. . Avan  os Tecnol  gicos na Obten  o , Purifica  o e Identifica  o de Galactooligosacar  deos e Estudo de suas Propriedades Pr  bi  ticas Technological Advances in the Collection , Purification and Identification of Galactooligosaccharide and Study of their Pre. v. 12, n. 4, p. 41–50, 2010.

TREMAROLI, V.; B  CKHED, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 242–249, 2012.

TRANTAFILOU, M.; MIYAKE, K.; GOLENBOCK, D. T.; TRANTAFILOU, K. Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. **J Cell Sci**, v. 115, n. Pt 12, p. 2603–2611, 2002.

TRICON, S.; BURDGE, G. C.; WILLIAMS, C. M.; CALDER, P. C.; YAQOOB, P. The effects of conjugated linoleic acid on human health-related outcomes. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n. 2, p. 171–182, 2005.

TSCH  P, M.; HEIMAN, M. L. Rodent obesity models: An overview. **Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes**, v. 109, n. 6, p. 307–319, 2001.

TURNBAUGH, P. J.; GORDON, J. I. The core gut microbiome, energy balance and obesity. **Journal of Physiology**, v. 587, n. 17, p. 4153–4158, 2009.

VAN HOFFEN, E.; RUITER, B.; FABER, J.; M'RABET, L.; KNOL, E. F.; STAHL, B.; ARSLANOGLU, S.; MORO, G.; BOEHM, G.; GARSSSEN, J. A specific mixture of short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides induces a beneficial immunoglobulin profile in infants at high risk for allergy. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 64, n. 3, p. 484–487, 2009.

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: Where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 112–124, 2008.

VERMEIRSSSEN, V.; DEPLANCKE, B.; TAPPENDEN, K. A.; VAN CAMP, J.; GASKINS, H. R.; VERSTRAETE, W. Intestinal transport of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg through a Caco-2 Bbe monolayer. **Journal of Peptide Science**, v. 8, n. 3, p. 95–100, 2002.

VESSBY, B.; GUSTAFSSON, I.-B.; TENGBLAD, S.; BOBERG, M.; ANDERSSON, A.; VESSBY, B. PDFlib PLOP: PDF Linearization, Optimization, Protection Desaturation and Elongation of Fatty Acids and Insulin Action. **Ann. N.Y. Acad. Sci**,

v. 967, p. 183–195, 2002.

VESSBY, B.; TENGBLAD, S.; LITHELL, H. Insulin sensitivity is related to the fatty acid composition of serum lipids and skeletal muscle phospholipids in 70-year-old men. **Diabetologia**, v. 37, p. 1044–1050, 1994.

VIERO, V. S. F.; FARIAS, J. M. Efeitos de dois protocolos de treinamento físico sobre o peso corporal e a composição corporal de mulheres obesas. n. 2004, p. 142–146, 2010.

VITAL, M.; HOWE, A.; TIEDJE, J. Revealing the Bacterial Synthesis Pathways by Analyzing (Meta) Genomic Data. **mBio**, v. 5, n. 2, p. 1–11, 2014.

WADE, W. G. The Genus *Eubacterium* and Related Genera. **Prokaryotes Vol. 4**, p. 823–835, 2006.

WALTERS, W., HYDE, E. R., BERG-LYONS, D., ACKERMANN, G., HUMPHREY, G., PARADA, A., GILBERT, J. A., JANSSON, J. K., CAPORASO, J. G., FUHRMAN, J. A., APPRILL, A., & KNIGHT, R. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. **mSystems**, 1(1), e00009–15. 2016.

WANG Q, GARRITY GM, TIEDJE JM, COLE JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Appl Environ Microbiol** 73: 5261–5267. 2007.

WHITE, P. A. S.; CERCATO, L. M.; ARAÚJO, J. M. D.; SOUZA, L. A.; SOARES, A. F.; BARBOSA, A. P. O.; R. NETO, J. M. de; MARÇAL, A. C.; MACHADO, U. F.; CAMARGO, E. A.; SANTOS, M. R. V.; BRITO, L. C. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 5, p. 339–345, 2013.

WONG, S. W.; KWON, M. J.; CHOI, A. M. K.; KIM, H. P.; NAKAHIRA, K.; HWANG, D. H. Fatty acids modulate toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27384–27392, 2009.

WOTING, A.; PFEIFFER, N.; LOH, G.; KLAUS, S.; BLAUT, M. Clostridium ramosum promotes High-Fat diet-induced obesity in Gnotobiotic Mouse Models. **mBio**, v. 5, n. 5, p. 1–10, 2014.

YAMAGUCHI, M.; UCHIDA, M. α -Lactalbumin suppresses interleukin-6 release after intestinal ischemia/reperfusion via nitric oxide in rats. **Inflammopharmacology**, v. 15, n. 1, p. 43–47, 2007.

YAQOUB, P. The Nutritional Significance of Lipid Rafts. **Annual Review of Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 257–282, 2009.

ZENG, B.; HAN, S.; WANG, P.; WEN, B.; JIAN, W.; GUO, W.; YU, Z.; DU, D.; FU, X.; KONG, F.; YANG, M.; SI, X.; ZHAO, J.; LI, Y. The bacterial communities associated with fecal types and body weight of rex rabbits. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–8, 2015.

ZHANG J, KOBERT K, FLOURI T et al. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. **Bioinformatics**, 30, 614–620. 2014.

ZHU, Q.; GAO, R.; WU, W.; QIN, H. The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. **Tumor Biology**, v. 34, n. 3, p. 1285–1300, 2013.

ZUÑIGA, A. D. G. Estratégia De Purificação Das Proteínas A-Lactoalbumina E B-Lactoglobulina Do Soro De Queijo. p. 155, 2003.

ZWAAL, R. F. A.; ROELOFSEN, B.; COMFURIUS, P.; VAN DEENEN, L. L. M. Organization of phospholipids in human red cell membranes as detected by the action of various purified phospholipases. **BBA - Biomembranes**, v. 406, n. 1, p. 83–96, 1975.

ANEXO 01

Protocolo produção de coacervado: Extração de proteínas do soro do leite.

1. Pesou-se 2,5 g de quitosana e 70g de ácido cítrico.
2. A quitosana + ácido cítrico foi misturada em 3000ml de água milli-Q por aproximadamente 2h – há presença de partículas flutuantes na solução (quitosana), pois a dissolução não é 100% [SOLUÇÃO 1].
3. Pesou-se 300g de soro de leite em pó e dissolvido em 3000ml de água milli-Q [SOLUÇÃO 2].
4. Preparou-se uma solução concentrada de NaOH (90%) [SOLUÇÃO 3].
5. As soluções 1 e 2 foram misturadas na razão de 1:1, o pH dessa mistura foi corrigido para 6 com a solução 3. A mistura foi homogeneizada por 30 min e deixado para descansar por mais 30 min.
6. Após esse período já é visível a separação de fases que remete a coacervação.
7. A solução do coacervado foi ressuspensa e levada em frascos de centrífuga.
8. A centrifugação foi a 2500 rpm, a temperatura ambiente, por 15 min.
9. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o coacervado retirado do fundo do tubo de centrífuga com espátulas, guardado em tubos falcon e congelado até o momento de sua liofilização.

ANEXO 02

Parecer de aprovação do comitê de ética no uso de animais da UMC



Título: "Influência do coacervado de proteínas do soro de leite na modulação da via inflamatória, microbiota intestinal e perfil de fosfolípidos em camundongos com obesidade induzida"

Protocolo: 004/2015

Natureza do Pedido: Pesquisa

Área de conhecimento: Biotecnologia

Nível: Doutorado

Orientador: Dra. Elisa Espósito

Pesquisador Responsável: Ms. Juliane Suzuki Amaral

Colaboradores: Dr. Luiz Miguel Batista Junior

Objetivo

O objetivo do projeto é verificar se o coacervado de PSL (COA) associado galactooligossacarídeo (GOS) reduz a expressão gênica e proteica de TLR-4 e TLR-2 nas diferentes porções do intestino: duodeno, ceco e cólon, e se essa redução leva à diminuição na expressão de adipocinas pró-inflamatórias *in vivo*. Adicionalmente, será investigada a capacidade do coacervado de PSL em modular a alteração de várias adipocinas e sua relação com a microbiota intestinal assim como o perfil de ácidos graxos dos fosfolípidos dos tecidos, uma vez que camundongos tratados com dieta hiperlipídica apresentaram alteração metabólica na presença de elevadas concentrações plasmáticas de LPS.

Parecer

A técnica de experimentação está justificada e de acordo com as exigências éticas da Lei nº. 11.794/ de 08 de outubro de 2008, que regulamenta o uso de animais em pesquisa científica.

Conclusão Aprovado

Mogi das Cruzes, 24 de Junho de 2015.


Prof.ª. Maria Santina de Castro Morini
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Universidade de Mogi das Cruzes – UMC

Parecer de aprovação do comitê de ética no uso de animais da UNIFESP



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Influência do coacervado de proteínas do soro do leite na modulação da via inflamatória, microbiota intestinal e perfil dos fosfolipídios em camundongos com obesidade induzida por dieta", protocolada sob o CEUA nº 3795230518, sob a responsabilidade de **Juliane Suzuki Amaral** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 28/05/2018.

We certify that the proposal "Coacervate whey protein influence on inflammatory pathway, gut microbiota and phospholipids profile in induced obesity mice", utilizing Isogenics mice, protocol number CEUA 3795230518, under the responsibility of **Juliane Suzuki Amaral** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 05/28/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2018** a **01/2019**

Área: **Biologia Celular/microbiologia, Imunologia E Parasitologia**

Origem: **CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (UNICAMP)**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 5 semanas**

N: **---**

Linhagem: **C57BL/6**

Peso: **20 a 25 g**

Local do experimento: Universidade de Mogi das Cruzes Biotério da Universidade de Mogi das Cruzes Av. Cândido Xavier de Almeida Souza, 200 CEP 08780-911 Mogi das Cruzes - SP

São Paulo, 28 de maio de 2018

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

ANEXO 03

Extração de lipídeos totais do tecido intestinal

Amostras de 50mg de tecido foram pesados em balança de precisão, com sensibilidade 0,0001g. em seguida, adicionado 2ml de solução de clorofórmio: metanol (:1) e 0,5 ml de água deionizada. As amostras foram homogenizadas em microprocessador Sentry® modelo Tempest I.Q., a 25000 rpm, por 45 segundos.

Após a homogeneização, as amostras foram transferidas para tubos de ensaio com tampa teflon, e os frascos utilizados na extração foram lavados com clorofórmio, para evitar contaminação. Os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos.

Após centrifugação, a camada orgânica inferior foi removida através da técnica da dupla pipeta, que consiste em colocar uma pipeta Pasteur longa dentro de outra curta. Com a pipeta curta, a camada inferior é retirada e transferida para outro frasco. A pipeta curta foi lavada com clorofórmio e esse processo foi repetido por 3 vezes, para extração total dos lipídeos teciduais.

Os extratos finais foram transferidos para frascos menores, e as amostras foram evaporadas com Nitrogênio e vedadas até serem processadas pela técnica de cromatografia de coluna delgada.

ANEXO 04

Separação das classes de lipídeos em cromatografia de camada delgada (TLC)

As placas utilizadas são de sílica, com 20 X 20 cm, e foram aquecidas em estufa a 100°C por 60 minutos. As amostras foram ressuspendidas em 200ul de hexano e pipetadas na placa (04 amostras por placa). Para que a corrida seja eficiente, é necessário que haja pelo menos 10ug de lipídeos na amostra.

As classes que foram separadas foram: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esfingomielina sendo, portanto, todos polares. Para os lipídeos polares utilizou-se uma mistura de 130ml de clorofórmio + 35ml de metanol + 4ml de água, para a corrida dos lipídeos na placa.

Os tanques de vidro utilizados para a corrida foram lavados com a mesma mistura da corrida e a mistura adicionada ao tanque. A placa foi colocada em pé dentro do tanque em contato com a mistura e permaneceu um tempo de 60 a 70 minutos. As placas foram retiradas e coradas com fluoreína (2% de etanol) e reveladas usando luz UV.

As bandas foram marcadas com um lápis, raspadas e eluídas com metanol. As amostras eluídas foram secadas com nitrogênio, ressuspendidas em 600ul de hexano e injetadas no cromatógrafo gasoso para identificação dos ácidos graxos constituintes de cada classe lipídica.

ANEXO 05

Illumina 16S Primer Constructs (515f-926r)

Illumina 5' Adapter	Golay Barcode	Forward Primer Pad	Forward Primer Linker	515f forward primer	Primer For PCR
AATGATACGGCGAC	TCCAT			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	ACCGG	TATGG		MGCCGCGG	GCTTCCATACCGGAATATGGTAATTGTGTG
CGCT	AA	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	AGCCC			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	TGCTA	TATGG		MGCCGCGG	GCTAGCCCTGCTACATATGGTAATTGTGTG
CGCT	CA	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	CCTAA			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	CGGTC	TATGG		MGCCGCGG	GCTCCTAACGGTCCATATGGTAATTGTGTG
CGCT	CA	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	CGCGC			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	CTTAAA	TATGG		MGCCGCGG	GCTCGCGCCTTAACTATGGTAATTGTGTG
CGCT	C	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	TATGG			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	TACCC	TATGG		MGCCGCGG	GCTTATGGTACCCAGTATGGTAATTGTGTG
CGCT	AG	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	TACAAT			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	ATCTG	TATGG		MGCCGCGG	GCTTACAATATCTGTTATGGTAATTGTGTG
CGCT	T	TAATT	GT	TAA	CAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	AATTTA			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	GGTAG	TATGG		MGCCGCGG	GCTAATTTAGGTAGGTATGGTAATTGTGTG
CGCT	G	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	GACTC			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	AACCA	TATGG		MGCCGCGG	GCTGACTCAACCAGTTATGGTAATTGTGTG
CGCT	GT	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	ATGCT			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	GCAAC	TATGG		MGCCGCGG	GCTATGCTGCAACACTATGGTAATTGTGTG
CGCT	AC	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	ACTCG			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	CTCGC	TATGG		MGCCGCGG	GCTACTCGCTCGCTGTATGGTAATTGTGTG
CGCT	TG	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	TTCCTT			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	AGTAG	TATGG		MGCCGCGG	GCTTTCCTTAGTAGTTATGGTAATTGTGTG
CGCT	T	TAATT	GT	TAA	CAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	CGTCC			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	GTATG	TATGG		MGCCGCGG	GCTCGTCCGTATGAATATGGTAATTGTGTG
CGCT	AA	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	ACGTG			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	AGGAA	TATGG		MGCCGCGG	GCTACGTGAGGAACGTATGGTAATTGTGTG
CGCT	CG	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	GTTTG			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	CCCTG	TATGG		MGCCGCGG	GCTGGTTGCCCTGTATATGGTAATTGTGTG
CGCT	TA	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	CATATA	TATGG		GTGYCAGC	AATGATACGGCGACACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	GCCCG	TAATT	GT	MGCCGCGG	GTCATATAGCCCGATATGGTAATTGTGTG

CGCT	A			TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	GCCTA			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	TGAGA	TATGG		MGCCGCGG	GCTGCCTATGAGATCTATGGTAATTGTGTG
CGCT	TC	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	CGGGA			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	CACCC	TATGG		MGCCGCGG	GCTCGGGACACCGATATGGTAATTGTGTG
CGCT	GA	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	CTGTC			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	TATACT	TATGG		MGCCGCGG	GCTCTGTCTATACTATATGGTAATTGTGTGY
CGCT	A	TAATT	GT	TAA	CAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	TATGC			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	CAGAG	TATGG		MGCCGCGG	GCTTATGCCAGAGATTATGGTAATTGTGTG
CGCT	AT	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	CGTTT			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	GGAAT	TATGG		MGCCGCGG	GCTCGTTTGAATGATATGGTAATTGTGTG
CGCT	GA	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	AAGAA			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	CTCAT	TATGG		MGCCGCGG	GCTAAGAACTCATGATATGGTAATTGTGTG
CGCT	GA	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	TGATAT			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	CGTCT	TATGG		MGCCGCGG	GCTTGATATCGTCTTTATGGTAATTGTGTGY
CGCT	T	TAATT	GT	TAA	CAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	CGGTG			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	ACCTA	TATGG		MGCCGCGG	GCTCGGTGACCTACTTATGGTAATTGTGTG
CGCT	CT	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA
AATGATACGGCGAC	AATGC			GTGYCAGC	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC
CACCGAGATCTACA	GCGTA	TATGG		MGCCGCGG	GCTAATGCGGTATATATGGTAATTGTGTG
CGCT	TA	TAATT	GT	TAA	YCAGCMGCCGCGGTAA

ANEXO 06

Purificação de produtos finais da reação de PCR com *beads* magnéticas

Para a purificação dos produtos de PCR, foi utilizado kit *Agentcourt AMPure x P Magnetic particles manufactured by Seradyn*. As *beads* foram agitadas em vórtex por 30 segundos e um volume de 20ul foi transferida para todo o volume da amostra que veio da PCR, homogeneizando bem com a pipeta. A solução foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos, sem agitação.

Os tubos foram colocadas na estante magnética por 2 minutos ou até que a *beads* se aglomerem e o sobrenadante fique transparente. Com os tubos ainda na estante, descartou-se o sobrenadante com uma pipeta e iniciou-se as etapas de lavagem.

Com os tubos ainda na estante, foi adicionado 200ul de etanol 80% por 30 segundos e desprezado, e o processo repetido por 3 vezes, sendo esta a etapa de lavagem das *beads*. As *beads* foram deixadas para secar ao ar livre por 10 minutos.

Os tubos foram retirados da estante e adicionado 27,5ul de Tris 10nM pH8,5 nos tubos, que vai retirar o DNA das *beads*. Após homogeneização, os tubos foram colocados novamente na estante para retirar as *beads*, que já estavam sem DNA.

A solução de Tris no tubo está com DNA purificado e este foi transferido para um tubo estéril até o momento do sequenciamento.